



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پزشکی شهید بابایی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی

عنوان پایان نامه

بررسی اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاد

In vitro درخت واسپند

استاد راهنما

دکتر مهرزاد سرایی صحنه سرایی

اساتید مشاور

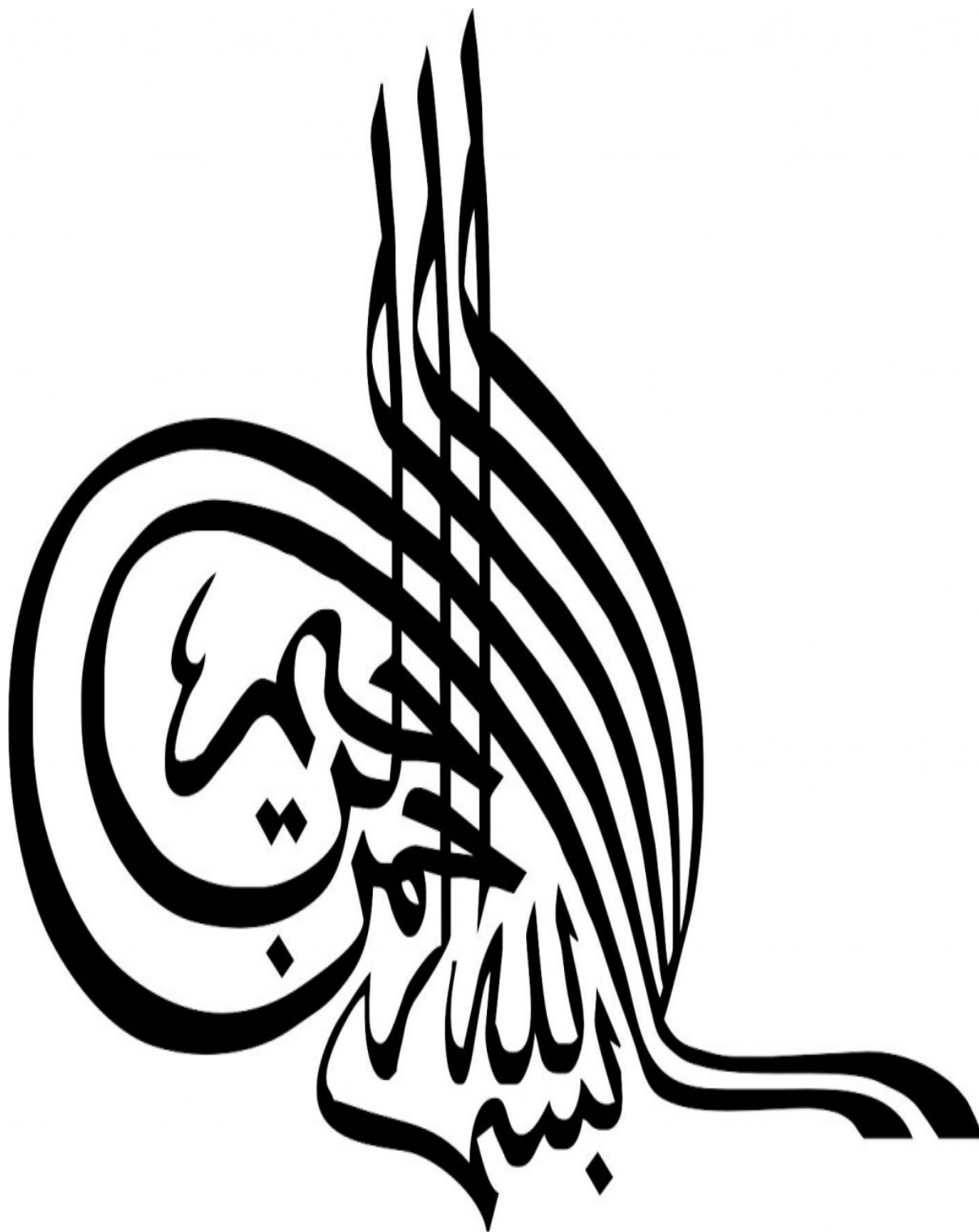
دکتر عباس آزادمهر

دکتر حسن جهانی هاشمی

نگارش: محترم آدینه

سال تحصیلی: 1393-94

شماره پایان نامه : 62



چکیده فارسی:

مقدمه: داروهای سنتتیک ضد توکسوپلازما دارای اثرات جانبی مختلفی اند، به ویژه آنکه سبب اختلال در خونسازی می شوند که در عفونت های اولیه دوران بارداری بسیار مهم است. دستیابی به یک داروی جدید با اثرات جانبی کمتر از اهداف مهم تحقیقاتی توکسوپلاسماست. در سال های اخیر نشان داده شده است که برخی عصاره ها و فراکشن های گیاهی دارای اثرات مهاری بر روی تاکی زوئیت های توکسوپلازما در کشت سلولی هستند.

هدف: مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات کشندگی و مهار کنندگی عصاره های گیاهان کاکوتی (*Ziziphora tenuior*)، زنجبیل (*Zingiber officinale*)، برگ گردو (*Juglans regia*)، آزاددرخت (*Melia azedarach*) و اسپند (*Peganum harmala*) بر تاکی زوئیت توکسوپلازما در شرایط برون تنی عاری از سلول و کشت سلول انجام شد.

مواد و روش ها: تاکی زوئیت های تکثیر یافته در صفاق موش ها، با نرمال سالین جمع آوری و شستشو داده شدند. سپس، 10^6 تاکی زوئیت تازه با غلظت های 50، 100، 200 و 10 میلی گرم در میلی لیتر هر یک از عصاره های کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاد درخت و اسپند به طور جداگانه در داخل میکروتیوپ مجاورت داده شد. بعد از مدت زمان های 10، 30 و 45 دقیقه انکوباسیون، تاکی زوئیت ها با متیلین بلو قلیائی رنگ آمیزی شدند و سپس درصد تاکی زوئیت های کشته شده به کمک میکروسکوپ نوری شمارش و با نمونه های کنترل (بدون مجاورت با عصاره ها) مقایسه شد. همچنین، از روش زیست سنجی در موش ها برای اثبات کشته شدن تاکی زوئیت ها استفاده شد. در تجارب دیگر، تاکی زوئیت ها با غلظت های 50، 100 و 200 میکروگرم در میلی لیتر عصاره های کاکوتی، برگ گردو و اسپند در کشت سلولی هلا

مجاورت داده شدند. داروی پریمتامین نیز به عنوان کنترل استفاده شد. اثر سایتوتوکسیسیتی عصاره ها و پریمتامین با روش MTT تعیین شد و مقادیر EC50 و Selectivity آنها محاسبه شد. تمامی آزمایشات به صورت سه گانه با سه بار تکرار انجام شد. داده ها با استفاده از نرم افزار (SPSS ver16.0) و آزمون های آماری ANOVA و Post Hoc Tests آنالیز گردید. مقادیر EC50 با استفاده از نرم افزار Prism محاسبه شد.

یافته ها: تمامی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با عصاره های کاکوتی، برگ گردو و اسپند در غلظت 200 و 100 میلی گرم در میلی لیتر بعد از 10، 30 و 45 دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق کشته شدند. در غلظت 50 میلی گرم در میلی لیتر عصاره برگ گردو نیز 100٪ اثر کشندگی داشت. درصد کشندگی زنجبیل در بالاترین حد $80/75 \pm 9/53$ ٪ و در کمترین حد $10/86 \pm 3/42$ ٪ بود. بالاترین حد کشندگی آزاد درخت $5/24 \pm 2/49$ ٪ بود.

به روش زیست سنجی در موش، تمامی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره ها که به روش رنگ آمیزی 100٪ کشته شده بودند، تایید شد و همه موش ها تا یک ماه پس از تلقیح زنده ماندند. در محیط کشت سلولی، EC50 و Selectivity به ترتیب برای کاکوتی $154/7$ و $0/86$ ، برگ گردو $207/4$ و $0/78$ و اسپند $179/1$ و $0/52$ بود. همچنین این مقادیر برای داروی پریمتامین، $0/176$ و $3/40$ بود.

نتیجه گیری: تمامی عصاره ها فعالیت ضد توکسوپلاسمایی وابسته به دوز داشتند و این اثر برای کاکوتی، برگ گردو و اسپند به طور معنی دار بیشتر از زنجبیل و آزاد درخت بود.

کلمات کلیدی: توکسوپلاسمای گوندی ای، عصاره گیاهی، کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاد درخت، اسپند،

برون تنی

فهرست مطالب

عنوان	شماره صفحه
فصل اول: مقدمه	1
اهمیت توکسوپلاسم و توکسوپلاسموز	2
تاریخچه شناسایی توکسوپلاسم گوندی ای	4
مروری بر مطالعات توکسوپلاسم در 25 سال اخیر	5
تاکسونومی توکسوپلاسم گوندی ای	7
مرفولوژی و اشکال مختلف توکسوپلاسم گوندی ای	7
اندامک های ترشحي راسي توکسوپلاسم	10
چرخه زندگي توکسوپلاسم	11
راههای شایع انتقال توکسوپلاسم	13
راههای نادر انتقال توکسوپلاسم	14
انتشار جغرافیایی و شیوع توکسوپلاسم در نقاط مختلف کره زمین	16
انتشار جغرافیایی و شیوع توکسوپلاسم در نقاط مختلف ایران	17
بیماریزایی و علائم بالینی توکسوپلاسموز	17
روشهای تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز	20

23	کنترل و پیشگیری توکسوپلاسموز
22	درمان توکسوپلاسموز
25	مرورری بر مکانیسم عمل داروهای توکسوپلاسم
26	مرورری بر اهمیت گیاهان دارویی
28	مرورری بر انواع گیاهان دارویی مورد استفاده برای درمان عفونت ها در طب سنتی
29	مرورری بر گیاهان مورد مطالعه، خواص درمانی و ترکیبات تشکیل دهنده آنها
29	گیاه کاکوتی
30	گیاه زنجبیل
33	گیاه برگ گردو
33	گیاه آزاد درخت
34	گیاه اسپند
37	مرورری بر تست MTT، اساس تست و کاربرد آن
39	فصل دوم: بیان مسئله ، مرور متون، اهداف و فرضیات
39	بیان مسئله
41	اهداف و فرضیات
43	اهداف کاربردی

- 43 فرضیه ها (Hypothesis) یا سوال های پژوهش
- 43 مرور متون
- 43 مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه اثرات ضد میکروبی و ضد انگلی گیاهان دارویی
- 44 مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه اثرات ضد میکروبی و ضد انگلی گیاهان مورد مطالعه
- 47 مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه اثرات ضد توکسوپلاسمایی گیاهان دارویی
- 55 فصل سوم: مواد و روش ها فصل سوم: مواد و روش ها
- 55 3-1 - تهیه گیاهان مورد مطالعه و شناسایی آنها
- 55 3-2 - عصاره گیری
- 55 3-3 - تهیه و نگهداری سویه توکسوپلازما گوندی ای
- 55 3-4 - ارزیابی اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی
- 55 3-4-1 - اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در شرایط برون تنی عاری از سلول
- 56 3-4-2 - تهیه و آماده سازی عصاره های گیاهی
- 56 3-4-3 - تهیه غلظت های مختلف از عصاره ها
- 56 3-4-4 - تکثیر و آماده سازی تاکای زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای
- 57 3-4-5 - تهیه و آماده سازی رنگ متلین بلو قلیایی
- 57 3-4-6 - مجاورت عصاره های گیاهی با تاکای زوئیت ها و تعیین درصد مورتالیتی

7-4-3- زیست سنجی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با عصاره ها در موش.....58

5-3- اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در کشت

سلولی.....59

1-5-3- دودمان سلولی مورد استفاده، تهیه، تکثیر و نگهداری

آن.....59

2-5-3- محلول های مورد نیاز.....59

- بافر فسفات سالین (PBS).....59

- محلول رنگ آمیزی تریپان بلو و روش تهیه60

-تهیه محیط مغذی برای کشت سلول60

- شمارش سلول های هلا و تعیین ویابلیتی سلول ها61

-فرمول شمارش سلول ها (Hela)61

-فرمول محاسبه Viability61

3-5-3- آماده سازی تاکی زوئیت ها61

4-5-3- آماده سازی عصاره ها برای مجاورت با تاکی زوئیت ها در کشت سلولی62

5-5-3- تهیه و آماده سازی داروی پریمتامین62

63-3-5-6- مجاورت عصاره های گیاهی و داروی پریمتامین با تاکی زوئیت ها.....

65-3-5-7- سنجش اثر سایتوتوکسیسیتی با روش MTT.....

67 فصل چهارم : نتایج

68 اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در شرایط برون تنی عاری از سلول.....

68 میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره کاکوتی.....

70 میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره زنجبیل.....

72 میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره برگ گردو.....

73 میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره آزاددرخت.....

76 میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره اسپند.....

78 نتایج زیست سنجی در موش

78 اثر مهاری عصاره های گیاهی بر تاکی زوئیت های توکسوپلاسم در کشت سلولی.....

78 فصل پنجم : بحث و بررسی

78 بحث.....

89 نتیجه گیری

پیشنهادهات	89
منابع	90
خلاصه انگلیسی	104
فهرست جداول	68
جدول 1- میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلاسمما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه کاکوتی	68
جدول 2- میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلاسمما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه زنجبیل	70
جدول 3- میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلاسمما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه برگ گردو	72
جدول 4- میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلاسمما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه آزاددرخت	74
جدول 5- میانگین درصد مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلاسمما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه اسپند	76
جدول 6- نتایج آزمون تعقیبی توکی در مقایسه چند گانه	77
جدول 7- اثرمهارى عصاره های اتانولی گیاهان کاکوتی، برگ گردو و اسپند بر تاکی زوئیت های توکسوپلاسمما گوندی ای در کشت سلولی HeLa	77
فهرست اشکال	69

- شکل 1- درصد مورتالیتی تاکی زوئیت هادر غلظت های 10، 50، 100 و 200 میلی گرم درمیلی لیتر عصاره کاکوتی در مدت زمان 10، 30 و 45 دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه 69
- شکل 2- درصد مورتالیتی تاکی زوئیت هادر غلظت های 10، 50، 100 و 200 میلی گرم درمیلی لیتر عصاره زنجبیل در مدت زمان 10، 30 و 45 دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه 71
- شکل 3- درصد مورتالیتی تاکی زوئیتها در غلظت های 10، 50، 100 و 200 میلی گرم درمیلی لیتر عصاره برگ گردو در مدت زمان 10، 30 و 45 دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه 73
- شکل 4- درصد مورتالیتی تاکی زوئیتها در غلظت های 10، 50، 100 و 200 میلی گرم درمیلی لیتر عصاره آزاد درخت در مدت زمان 10، 30 و 45 دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه 75
- شکل 5- درصد مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های 10، 50، 100 و 200 میلی گرم درمیلی لیتر عصاره اسپند در مدت زمان 10، 30 و 45 دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه 74
- شکل 6- مقایسه درصد ویا بیلیتی غلظت های مختلف عصاره های کاکوتی و داروی پیریمتامین در سلول های هلائی آلوده به تاکی زوئیت های توکسوپلازما در مقایسه با کنترل 79
- شکل 7- مقایسه درصد ویا بیلیتی غلظت های مختلف عصاره های برگ گردو داروی پیریمتامین در سلول های هلائی آلوده به تاکی زوئیت های توکسوپلازما در مقایسه با کنترل 80
- شکل 8- مقایسه درصد ویا بیلیتی غلظت های مختلف عصاره های اسپند و داروی پیریمتامین در سلول های هلائی آلوده به تاکی زوئیت های توکسوپلازما در مقایسه با کنترل 81

کلمات اختصاری

PBS	Phosphate buffer saline
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide
OD	optical density
HFF	human foreskin fibroblast
DMSO	Dimethyl sulfoxide
CDC	Centers for Disease Control and Prevantion
PCR	Polymerase Chain Reaction
TD 50	Toxic dose
ID50	Inhibitory dose
LD50	Lethal dose
EC50	Effective Concentration
Hela	Henrietta Lacks
Pen strep	Penicillin streptomycin

فصل اول

مقدمه

اهمیت توکسوپلاسم و توکسوپلاسموز

توکسوپلاسم و توکسوپلاسموز از چند جنبه دارای اهمیت خاص است.

1. از نظر گستردگی جغرافیایی و میزان شیوع: توکسوپلاسم از جمله انگل هایی است که بیشترین گستردگی جهانی دارد. به طوری که به جز در مناطق خیلی محدود کره زمین، این انگل در تمامی مناطق کره زمین انتشار دارد. از طرف دیگر، این انگل از شایع ترین انگل های انسانی است. به طوری که حدود یک سوم جمعیت کره زمین از نظر سرولوژی توکسوپلاسم مثبت می باشند.

2. از نظر تنوع میزبان: توکسوپلاسم از جمله انگل هایی است که میزبان های متعددی دارد. به طوری که انواع مهره داران خونگرم به این انگل آلوده می شوند. این تنوع گسترده میزبان در حفظ و بقای انگل در طبیعت بسیار نقش دارد.

3. از نظر بیماریزایی: توکسوپلاسموز در دو مورد با تظاهرات بالینی شدیدی بروز می کند، شامل توکسوپلاسموز مادرزادی و توکسوپلاسموز در افرادی که دچار اختلال عملکرد سیستم ایمنی می شوند. تا پیش از شایع شدن سندرم نقص سیستم ایمنی (ایدز)، اهمیت عمده توکسوپلاسموز به موارد مادرزادی آن مربوط می شد که به سبب ضایعات شدید مغزی و چشمی، اثرات ماندگاری بر جا می گذارد. با جهانی شدن ایدز در اوایل دهه 80 میلادی، توکسوپلاسم یک فرصت طلب مهم در این بیماران شناخته شد که در این افراد انگل های نهفته در کیست های بافتی مجدداً فعال شده و ضایعات مغزی وسیعی ایجاد می کند که تهدید کننده حیات است. به طوری که این انگل به عنوان مهمترین عامل ایجاد کننده آنسفالیت در بیماران ایدزی شناخته شد. همچنین، با افزایش رو به رشد استفاده از داروهای ایمنوساپرسیو و سیتوتوکسیک در

موارد پیوند اعضا، ابتلا به بدخیمی ها و سایر اختلالات ایمنی، توکسوپلاسمای به عنوان یک تهدید کننده حیات در این موارد نیز اهمیت روزافزونی پیدا کرد.

یکی از جنبه هایی مهم بیماریزایی توکسوپلاسمای که در سال های اخیر مورد توجه قرار گرفته است، نقش احتمالی این انگل در بروز علائم و بیماری های مزمن مغزی به ویژه اسکیزوفرنیاست. همچنین ارتباط اپیدمیولوژی بین این انگل و تغییرات رفتاری، شخصیتی، حافظه، یادگیری و صرع گزارش شده است.

4. از نظر آزمایشگاهی: تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز از پرچالش ترین موارد تشخیص آزمایشگاهی بیماری های انگلی است. به طوری که همواره بخش عمده ای از تحقیقات توکسوپلاسمای را به خود اختصاص داده است. مهمترین مشکل آن تمایز عفونت های حاد از مزمن است.

5. از نظر درمانی: درمان توکسوپلاسموز با محدودیت هایی همراه است و داروهای سنتتیک ضد توکسوپلاسمای دارای اثرات جانبی قابل توجهی اند و ضمناً فقط بر تاکی زوئیت ها موثرند و ریشه کن کننده عفونت نیستند.

6. از نظر افق های تحقیقاتی: توکسوپلاسمای انگل پیچیده ای است و ناشناخته های فراوانی دارد. به طور مثال، علیرغم اینکه حدود 60 سال پس از توصیف اولیه این انگل، چرخه زندگی آن در طبیعت به طور کامل شناخته شد ولی هنوز نکات ناشناخته ای در چرخه زندگی آن وجود دارد.

7. از نظر الگو بودن: توکسوپلاسمای یک الگوی مناسبی برای انواع مطالعات سلولی است.

8. از نظر دامپزشکی: توکسوپلاسمای از زئونوزهای مهم تلقی می شود. این انگل یک عامل مهم سقط در برخی دام ها به ویژه گوسفند، بز و خوک محسوب می شود.

تاریخچه شناسایی توکسوپلاسمای گوندی ای

توکسوپلاسمای گوندی ای در سال 1908 برای اولین بار توسط نیکول و مانسو (Nicol and Mancesux) در انستیتو پاستور تونس نزد گونه ای از جوندگان شمال آفریقا به نام کتنوداکتیلوس گوندی (*Ctenodactylus gundii*) شناسایی شد. نام توکسوپلاسمای از دو واژه یونانی *Toxon* به معنی قوس یا کمان و *Plasma* مترادف با شکل گرفته شده که بیانگر هلالی شکل بودن انگل است. در سال 1939 ولف (Wolf) و همکاران در نیویورک با جداسازی توکسوپلاسمای از ضایعات اعصاب مرکزی و چشم یک نوزاد وجود مشکل مادرزادی توکسوپلاسموز و مرگ زایا بودن آن را ثابت و گزارش کردند (1). توکسوپلاسموز اکتسابی نخستین بار توسط پینکرتن و واینمن (Pinkerton and Weinman) در سال 1940 پس از جداکردن انگل از ضایعات نکروتیک اندامهای بیماری از پرو گزارش گردید که بیمار از یک عفونت سیستمیک همراه با لنف آدنوپاتی مرده بود. در سال 1941 سابین (Sabin) آنسفالیت توکسوپلاسمایی کودکان را از ایالات متحده گزارش کرد. پس از او در زمینه توکسوپلاسمای و توکسوپلاسموز در انسان و حیوانات مطالعات زیادی انجام گرفت و تا سال 1956 اطلاعات جامعی در باره آن جمع آوری گردید. اما سیر تکاملی این تک یاخته تا مدتی حدود 60 سال پس از شناسایی به صورت یک معمای ناشناخته مانده بود و از نظر طبقه بندی در تک یاخته شناسی جای مشخصی نداشت. مطالعاتی که منتهی به روشن شدن چرخه زندگی انگل گردید در سال 1965 به وسیله هچی سن (Hutchison) انگل شناس انگلیسی روی گربه آغاز و بوسیله محققین زیادی پی گیری شد و در سال 1970 مشخص شد که توکسوپلاسمای نوعی کوکسیدیای روده گربه همانند جنس ایزوسپورا است (1 و 2).

مروری بر مطالعات توکسوپلاسمای در 25 سال اخیر

Boothroyd در مقاله ای در سال 2009 به 25 پیشرفت عمده در تحقیقات توکسوپلاسمای در طی 25 سال (1983-2008) اشاره کرده است. این مقاله به عنوان یکی از مقالات برتر انگل شناسایی شناخته شد. به طور خلاصه این 25 پیشرفت شامل موارد زیر است (3):

1- شناسایی ژنوتایپ های توکسوپلاسمای با استفاده از روش مولکولی مشخص شد که توکسوپلاسمای دارای 3 ژنوتایپ (کلون) اصلی I، II و III می باشد و بین سویه های جدا شده از انسان و حیوانات تفاوت بسیار کمی وجود دارد.

2- شناسایی تفاوت آنتی ژنی و بیوشیمیایی مراحل تکاملی توکسوپلاسمای (تاکای زوئیت ها و برادی زوئیت ها).

3- تبدیل تاکای زوئیت ها به برادی زوئیت ها تحت شرایط استرس در *in vitro*

4- دستکاری ژنوم توکسوپلاسمای در شرایط *in vitro*.

5- شناسایی ژنوم توکسوپلاسمای شامل 14 کروموزوم و 65-70 Mbp

6- آمیزش های آزمایشگاهی برای ترسیم فنوتایپ ها و ژنهای مهم.

7- شناسایی Apicoplast به عنوان یک پلاستید.

8- شناسایی نقش میکرونم ها از نظر ترشح مواد چسبنده مهمی که در حرکت سر خوردن و تهاجم سلولی نقش دارند.

9- مشارکت پروتئین های راپتری و میکرونم در اتصال سلولی در طی تهاجم.

10- شناسایی آنتی ژن های اختصاصی مرحله ای: آنتی ژنهای متصل به GPI Glycophosphatidylinositol در مراحل مختلف تکاملی.

- 11- آزاد شدن پروتئین هایی از دنس گرانول ها و راپتری ها از طریق غشا به داخل سلول.
- 12- ورود پروتئین های محلول به طور مستقیم به داخل سلول.
- 13- پلی مرفیسم پروتئین های مترشحه از راپتری.
- 14- شناسایی برخی مسیر های بیوشیایی در توکسوپلازما که بسیار شبیه گیاهان بوده و در حیوانات وجود ندارد.
- 15- شناسایی مسیرهای چندگانه برای تحریک ذاتی پاسخ ایمنی.
- 16- شناسایی القا IL-12 و تولید INF گاما به عنوان مدیاتور اصلی در پاسخ ایمنی علیه توکسوپلازما.
- 17- تعداد کمی از آنتی ژن های توکسوپلازما هدف پاسخ ایمنی قرار می گیرند.
- 18- نقش MHC به عنوان یک شاخص و متغیر مهم در بروز توکسوپلاسموز.
- 19- شناسایی اختلال مسیر اپوپتیک در سلول های آلوده به انگل .
- 20- تمایز آنسفالیت توکسوپلاسمایی در بیماران ایدزی از سایر بیماری ها با استفاده از تکنیک های تصویربرداری غیرتهاجمی .
- 21- PCR به عنوان یک روش حساس در تشخیص توکسوپلازما.
- 22- پیشرفت هایی در تمایز سرولوژیک عفونت های حاد از مزمن.
- 23- شناسایی عملکرد ارگانل به عنوان منبع مهم اهداف داروهای جدید.
- 24- استفاده از انگل تضعیف شده به عنوان یک کاندید مناسب برای تولید واکسن
- 25- توکسوپلازما و تاثیر آن بر رفتار میزبان.

تاکسونومی توکسوپلاسمای گوندی ای

1-1- جایگاه طبقه بندی توکسوپلاسمای گوندی ای در حال حاضر به ترتیب زیر می باشد (4):

Scientific classification	
Domain:	Eukaryota
kingdom:	Chromaveolata
Super Phylum:	Alveolata
Phylum:	Apicomplexa
Class:	Conoidasida
SubClass:	Coccidiasina
Order :	Eucoccidiorida
Family :	Sarcocystidae
Genus:	Toxoplasma
Species:	<i>gondii</i>

مرفولوژی و اشکال مختلف توکسوپلاسمای گوندی ای

توکسوپلاسمای طی مراحل مختلف سیر تکاملی نزد میزبانهای واسط و نهایی اشکال گوناگونی دارد از میان

این اشکال سه شکل به شرح زیر آلوده کننده است:

الف - تاکی زوئیت (Tachyzoite): این شکل از انگل که آندوزوئیت نیز نامیده میشود، در سیتوپلاسم

انواع یاخته های هسته دار میزبان های آلوده به روش آندودیوژنی (تقسیم دوتایی از طریق جوانه زدن در

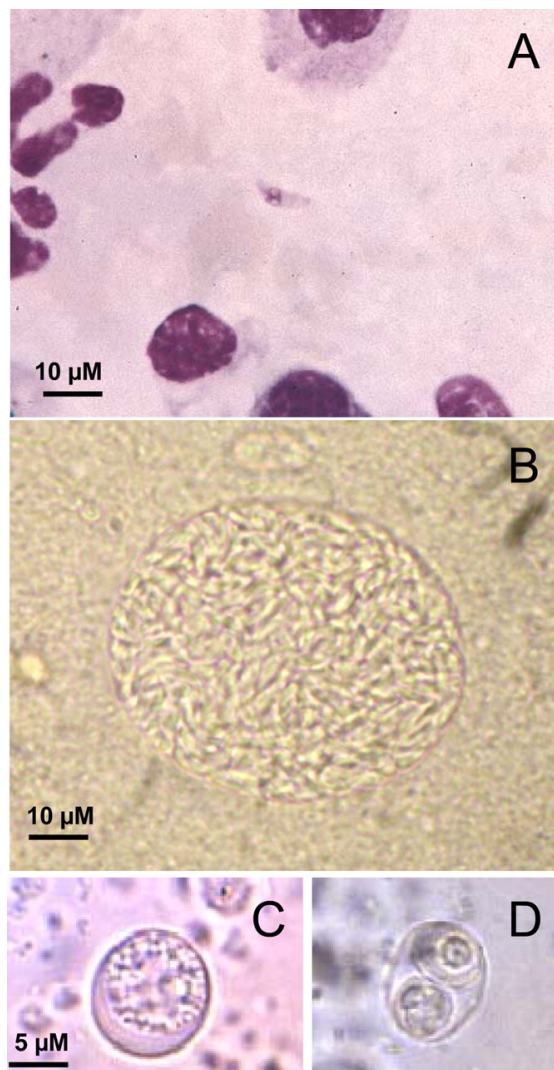
داخل سلول مادر) تکثیر می یابد. تاکی زوئیت ها اجسامی هلالی شکل یا بیضوی می باشند که انتهای

قدامی آنها باریکتر از انتهای خلفی است. طول آنها 4 تا 7 میکرومتر و عرض آنها 2 تا 4 میکرومتر است.

تاکی زوئیت های داخل و خارج سلولی را می توان در مایع صفاق موشهایی که بطور تجربی آلوده شده اند بوضوح مشاهده کرد (5).

ب- کیست نسجی (Tissue cyst): کیست نسجی به مجموعه ای از برادی زوئیت ها (Bradizoite) یا سیستم زوئیت ها گفته می شود که بوسیله یک جدار کیستی ظریف ولی محکم و مشخص محدود شده است. این جدار مشخص کیست نسجی را از یاخته های حاوی تاکی زوئیت ها متمایز میکند. کیست های نسجی اغلب کروی و برخی بیضوی هستند. اندازه ی آنها از 10 تا 200 میکرومتر متغیر است (5).

ج- اووسیست (Oocyst): اووسیست همان زیگوت است که از آمیزش گامت نر با گامت ماده در سلولهای اپی تلیال روده باریک گربه سانان با ترشح موادی به اطراف خود پوششی سخت و مقاوم ایجاد می کند که به آن اووسیست اطلاق می شود. اووسیست ها در موقع دفع کروی و غیرآلوده کننده هستند، اما وقتی در خارج از بدن میزبان در شرایط مناسب قرار گیرند اسپوروگونی انجام گرفته رسیده و آلوده کننده می شوند. اندازه اووسیست 9-11 در 11-14 میکرومتر است (1 و 2).



اشکال عفونی زای توکسوپلازما گوندی ای. A، تاکای زوئیت ؛ B. کیست نسجی ؛ C، اووسیست نارس ؛ D، اووسیست رسیده.

اندامک های ترشحی راسی توکسوپلاسم

تهاجم انگل به سلولهای میزبان در اثر ترشح پروتئین های سه اندامک ترشحی که در مجموعه راسی (Apical complex) قرار دارند، ارتباط دارد (5). آنتی ژن های دفعی - ترشحی حاصل از ترشحات گرانول های متراکم، میکرونم ها و راپتری های انگل می باشند.

گرانول های متراکم (Dense granule): ترشحات این ارگانل در طول تهاجم انگل به سلول میزبان و حتی بعد از استقرار انگل در حفره پارازیتوفروس ترشح می شود. ترشحات گرانول های متراکم در حفره پارازیتوفروس و غشاء آن و نیز در تشکیل شبکه لوله ای وزیکولی نقش دارد. گرانول های متراکم، فضای درونی حفره پارازیتوفروس را برای بقاء و تکثیر انگل مهیا می کنند. این پروتئین ها در تاکی زوئیت توکسوپلاسم شناسایی شده اند (6).

میکرونم ها (Microneme): ترشحات این ارگانل جزء مولکول های چسبنده در سطح سلول می باشند که ترشحات آنها اولین قدم در اتصال و تهاجم انگل به سلول میزبان می باشد. به دنبال ترشحات میکرونم و اتصال انگل به سلول میزبان، ترشحات ارگانل دیگری به نام راپتری وارد عمل می شود که باعث کاهش ویسکوزیته غشاء سلول میزبان و تسهیل ورود انگل به درون سلول می شود (6).

راپتری ها (Rhoptry): محتویات این ارگانل اغلب در حین تهاجم انگل به سلول میزبان به درون حفره پارازیتوفروس در حال رشد ترشح می شود و در فضای بین انگل و غشاء حفره پارازیتوفروس قرار می گیرد (6).

چرخه زندگی توکسوپلازما

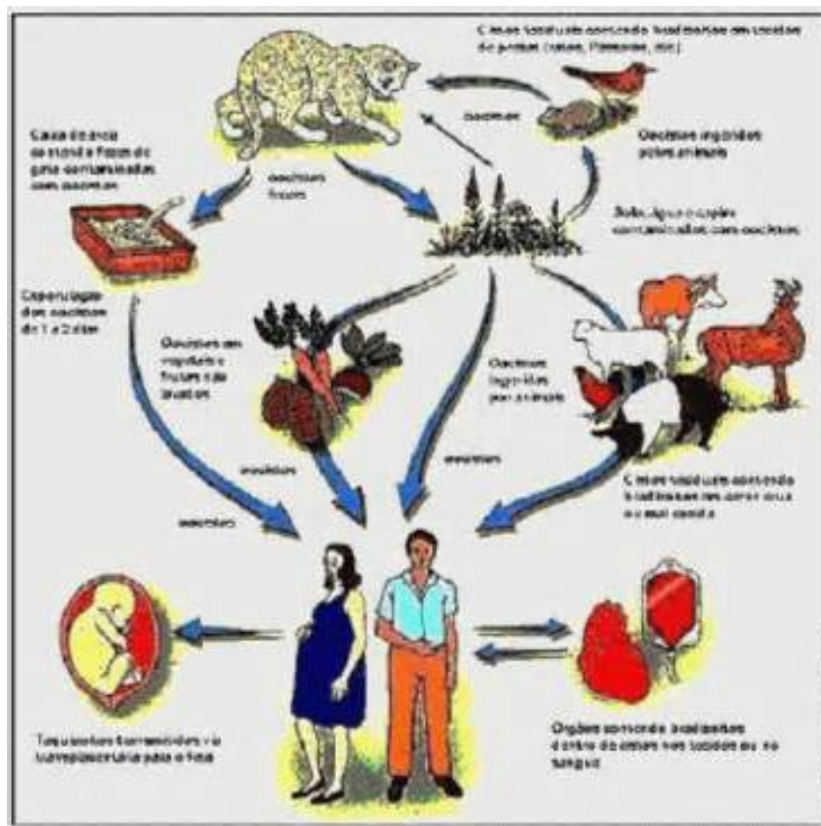
در چرخه زندگی این تک یاخته دو مرحله وجود دارد. یکی مرحله ی روده ای یا فاز ایزوسپوری که در یاخته های اپیتلیال جدار روده میزبان های نهایی طی می شود و یک مرحله خارج روده ای یا فاز توکسوپلاسمایی که در بافتهای تمام میزبانها (واسط و نهایی) انجام می پذیرد.

الف- مرحله روده ای: پس از بلعیده شدن هر یک از اشکال آلوده کننده توکسوپلازما به وسیله گربه، انگل وارد سلولهای اپیتلیال جدار روده حیوان شده، تبدیل به تروفوزوئیت میشود و از طریق شیزوگونی تکثیر می یابد. در هر شیزونت، 5 تا 40 مروزوئیت تکامل می یابد. دوره شیزوگونی تکرار می شود و مروزوئیت های حاصل از آخرین نسل شیزونت، سلولهای جنسی (میکروگامتوسیت ها و ماکروگامتوسیت ها) را بوجود می آورند. پس از آن گامتوگونی انجام می گیرد. میکروگامتوسیت ها تقسیم شده هر یک بین 12 تا 20 گامت نر (میکروگامت) دو تازکی و متحرک می سازد و ماکروگامتوسیت هم به گامت ماده (ماکروگامت) تکامل می یابد. از آمیزش این دو، زیگوت به وجود می آید. زیگوت با ترشح موادی به اطراف، جداری سخت و مقاوم می سازد که در این مرحله، اووسیست نامیده می شود. اووسیست حاوی اسپورونت (Sporont) از اپیتلیوم روده میزبان جدا شده به داخل مجرای روده می افتد و همراه با مدفوع گربه به محیط خارج می رسد. در خارج از بدن میزبان چنانچه در شرایط مطلوب (حرارت و رطوبت مناسب) قرار گیرد، اسپوروگونی انجام گرفته، اسپورنت به دو اسپوروبلاست تقسیم می شود و هر اسپوروبلاست پوششی به اطراف خود ترشح کرده، دو اسپوروسیست تشکیل می گردد. سپس هر اسپوروبلاست تقسیم شده و چهار اسپوروزوئیت عفونت زا تولید می کند. این اووسیست های رسیده برای تمام میزبان های انگل (واسط و نهایی) آلوده کننده هستند. اسپوروگونی در دمای 25 درجه سانتی گراد طی 2 تا 3 روز انجام می گیرد، اما در دمای پایین تر زمان طولانی تری لازم دارد. اسپوروگونی می تواند در

دمای زیر 4 درجه سانتی گراد و گرمای بالاتر از 37 درجه سانتی گراد انجام شود. اووسیست های رسیده و آلوده کننده بسیار مقاوم هستند، بطوریکه می توانند دو زمستان و یک تابستان را به خوبی تحمل کنند (1و2).

ب- **مرحله خارج روده ای:** مرحله خارج روده ای یک مرحله غیر جنسی نسجی است. در این مرحله انگل به شکل تاکی زوئیت های داخل و خارج سلولی و کیست نسجی دیده می شود. انسان و سایر میزبان های توکسوپلاسم معمولاً با خوردن گوشت خام یا گوشتی که خوب پخته نشده و آلوده به کیست های نسجی است و یا آب، سبزیجات و سایر مواد آلوده به اووسیست های رسیده ی توکسوپلاسم آلوده می شوند. کیست های نسجی در معده و اووسیست ها در روده شکافته شده، برادی زوئیت ها و اسپوروزوئیت ها آزاد می گردند. ارگانیسم های آزاد شده وارد سلول های روده شده به شکل تاکی زوئیت در می آیند. تاکی زوئیت ها در سیتوپلاسم سلول در یک حفره پارازیتوفوروس به روش آندودیوزنی تقسیم شده و تکثیر می یابند. تقسیم مکرر انگل یاخته میزبان را پر می کند. سرانجام یاخته متلاشی شده ، تاکی زوئیت ها آزاد می گردند و یاخته های همجوار را آلوده می سازند. تاکی زوئیت ها در داخل لنفوسیت ها ، گرانولوسیت ها و هیستوسیت ها و به طور آزاد همراه با جریان خون و لنف در تمام اعضا پخش شده و با از بین بردن یاخته های نسوج مختلف کانون های نکروزه به وجود می آورند. پارازیتی معمولاً از طریق پاسخ های ایمنی (خونی و سلولی) کنترل می شود. به طور طبیعی اگر سیستم ایمنی میزبان سالم باشد، مصونیت مانع تکثیر تاکی زوئیت ها شده و با ایجاد کیست های نسجی عفونت به حالت مزمن در می آید. کیست های نسجی توکسوپلاسم به طور معمول 7 تا 10 روز پس از آلودگی در بافت های مختلف میزبان به ویژه سیستم اعصاب مرکزی تشکیل می شوند ، اما زمانی که مصونیت کامل شد تمام تاکی زوئیت ها به شکل کیست نسجی در می آیند و یا از بین می روند. کیست های نسجی ابتدا در سیتوپلاسم یاخته های

بافت ها تشکیل میشوند و رشد می یابند . به مرور زمان قطر کیست افزایش یافته و یاخته ای که اطراف آن را گرفته متلاشی شده و کیست آزاد می گردد. کیست های آزاد بدون اینکه پاسخ التهابی در اطرافشان دیده شود ، سال ها و شاید تا پایان عمر میزبان زنده باقی می مانند. کیست های نسجی موجود در بافت های حیوانات آلوده یکی از منابع مهم آلودگی انسان و گوشت خواران به توکسوپلازما می باشند (1و2).



چرخه زندگی توکسوپلازما گوندی ای

راه های شایع انتقال توکسوپلازما:

الف) انتقال از راه دهان : در آلودگی های اکتسابی انتقال در اصل خوراکی است و معمولا از طریق خوردن اووسیست های واجد اسپوروزوئیت ها همراه با آب یا مواد غذایی و یا کیست های نسجی حاوی برادی

زوئیت ها همراه با گوشت خام یا خوب پخته نشده انجام می گیرد. گربه و گربه سانان مبتلا به توکسوپلاسم که اووسیست دفع می نمایند، اساسی ترین نقش را در انتقال و انتشار این تک یاخته دارند.

ب) انتقال از طریق جفت: توکسوپلاسمای گوندی ای می تواند در زنان بارداری که دچار عفونت اکتسابی شده اند و در دوره حاد بیماری می باشند از جفت عبور کرده جنین را آلوده نماید. انتقال انگل از مادر به جنین معمولاً زمانی اتفاق می افتد که مادر در دوره بارداری برای بار اول آلوده شده باشد. عبور توکسوپلاسمای از جفت و آلودگی جنین تقریباً در یک سوم زنان بارداری اتفاق می افتد که در زمان حاملگی برای بار اول آلوده شده اند (1و2).

راه های نادر انتقال توکسوپلاسمای:

1- انتقال از راه ترانسفوزیون خون: توکسوپلاسمای در مرحله حاد عفونت که به فرم تاکی زوئیت می باشد، می تواند از طریق انتقال خون به گیرنده منتقل شود. در انتقال از طریق خون، انتقال لوکوسیت ها نقش مهمتری دارد.

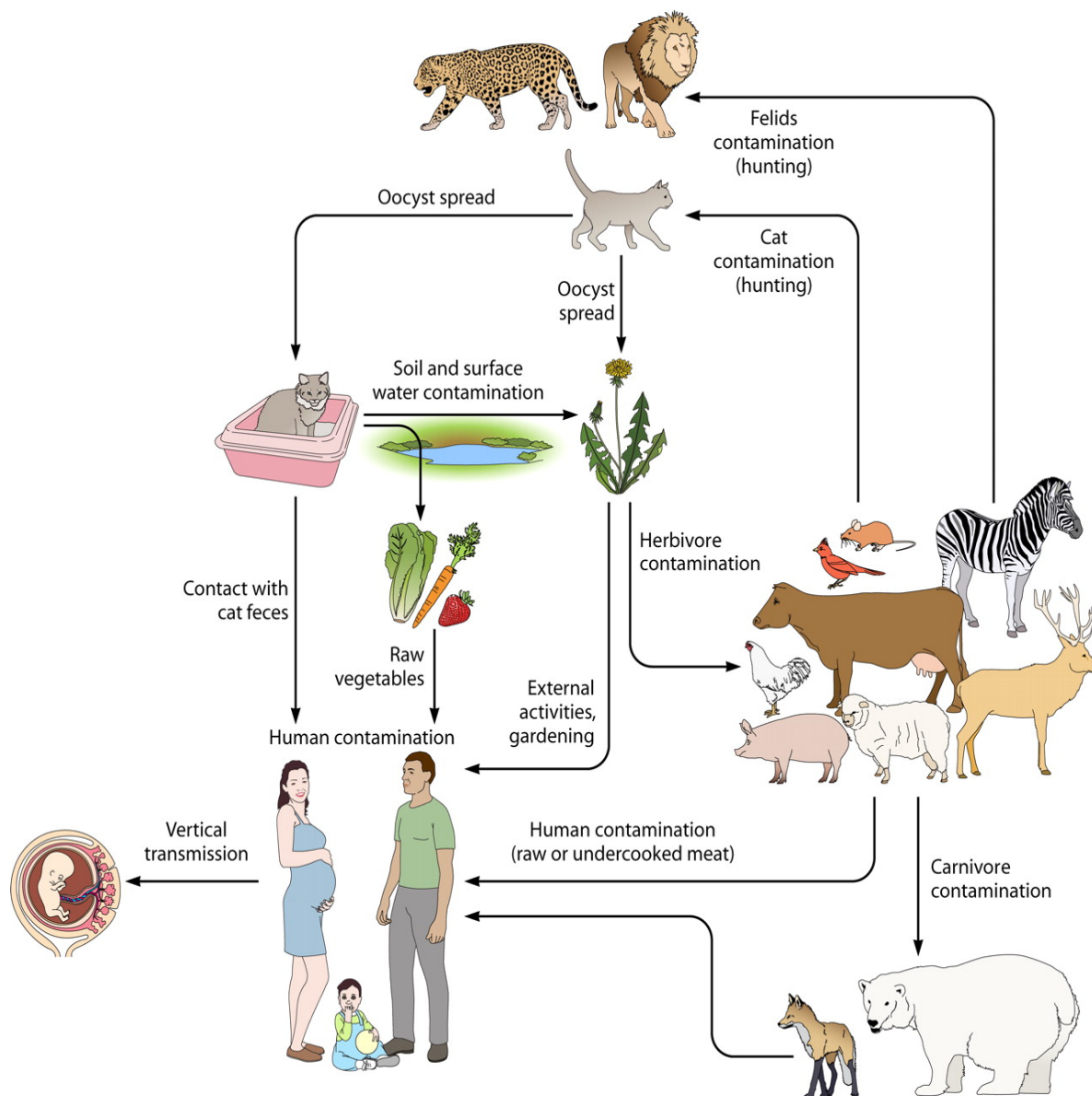
2- انتقال از راه خراش و زخم: این نوع انتقال بیشتر در کارکنان کشتارگاهها و کشاورزان اتفاق می افتد.

3- انتقال از راه پیوند عضو: پیوند عضو از دهنده آلوده به گیرنده غیر ایمن می تواند سبب انتقال توکسوپلاسمای شود که معمولاً به این طریق کیست های نسجی دخال دارند (7).

4- انتقال از طریق شیر خام، تخم مرغ، اشک و بزاق: این انگل می تواند 4 تا 7 روز در بزاق، اشک، ادرار و شیر زنده بماند. به این طریق تاکی زوئیت ها در انتقال دخالت دارند (1).

5- انتقال از راه بندپایان: بندپایان در انتقال مکانیکی انگل می توانند نقش داشته باشند. نقش انواعی از

مگس ها، سوسک ها و کنه های ایکسودیده در انتقال این انگل مشخص شده است (8).



منابع عفونت انسان به توکسوپلازما گوندی ای

انتشار جغرافیایی و شیوع توکسوپلاسمای در نقاط مختلف کره زمین:

آلودگی به توکسوپلاسمای در حیوانات علف خوار، گوشت خوار و همه چیز خوار شامل تمام پستانداران و پرندگان در سرتاسر جهان انتشار دارد. چرخه زندگی این تک یاخته معمولاً بین گربه و پستانداران کوچک و پرندگان انجام می گیرد ولی انسان و سایر مهره داران خونگرم نیز با مصرف مواد آلوده به اووسیست رسیده انگل و یا کیست نسجی آن آلوده می گردند. مطالعات سرواپیدمیولوژیک انسانی توکسوپلاسمای نشان می دهد که در اکثر مناطق 25 تا 75 درصد از مردم ممالک مختلف به عفونت های مزمن و بدون علائم بالینی این انگل آلوده هستند. فراوانی آلودگی در کشورهای مختلف و همینطور در مناطق مختلف یک کشور بسته به شرایط جوی و جغرافیایی، فرهنگ غذایی و نوع پخت و پز، بهداشت عمومی و وفور گربه متغیر است. بالاترین میزان آلودگی در مناطق گرم و مرطوب مشاهده می شود (1و2).

مطالعات گسترده ای که در دهه اخیر انجام شده است، دلالت بر این دارد که در اکثر مناطق 20 درصد افراد از نظر سرولوژی توکسوپلاسمای مثبت می باشند. به طور مثال 40/5 درصد از جمعیت مورد مطالعه در کشور هلند از نظر سرولوژی توکسوپلاسمای مثبت بودند همچنین 84٪ از خانمهای حامله در پاریس علیه توکسوپلاسمای گوندی آنتی بادی داشتند و این درصد در شهر نیویورک 32٪ و در لندن 22٪ بود (9). عفونت توکسوپلاسمایی در آمریکای لاتین بخصوص در نواحی گرمسیری انتشار وسیعی دارد. بطوریکه در 65٪ جمعیت بالای 60 سال آنتی بادی توکسوپلاسمایی قابل تشخیص می باشد (10). بر اساس گزارشات منتشره در دهه اخیر، 68/4٪ از 263 زنان باردار مراجعه کننده برای مراقبت های پیش از زایمان در اتیوپی (11) و 83/5٪ از 382 دانش آموزان ابتدائی در جنوب نیجریه دارای آنتی بادی ضد توکسوپلاسمای در سرم بودند (12).

انتشار جغرافیایی و شیوع توکسوپلاسم در نقاط مختلف ایران:

در ایران بطور پراکنده بررسی هایی در مورد شیوع توکسوپلاسم صورت گرفته و همگی حاکی از میزان شیوع بالا و متفاوت توکسوپلاسموز در نقاط مختلف کشور است. بر اساس این مطالعات حداقل 20 درصد افراد در اکثر مناطق کشور از نظر آنتی بادی ضد توکسوپلاسم مثبت می باشند و بیشترین آلودگی از استان های شمالی کشور گزارش شده است. 28/8٪ از 500 نمونه سرم افراد اهدا کننده خون در جنوب غربی ایران (کرمان) (13)، 24/6٪ زنان با سقط جنین و 21/5٪ زنان با زایمان طبیعی در بین 260 نمونه در اهواز (14)، 27/4٪ از 501 زنان باردار در خوزستان (15)، 1/4٪ و 37/2٪ به ترتیب از نظر آنتی بادی IgG و IgM در بین 500 زنان باردار در زنجان (16)، 34٪ از 400 خانم مراجعه کننده برای آزمایشات پیش از ازدواج در قزوین (17)، 71٪ از 612 خانم باردار در ساری (18) از نظر آنتی بادی ضد توکسو پلاسم مثبت بودند.

بیماریزایی و علائم بالینی توکسوپلاسموز

بیماریزایی: توکسوپلاسم معمولاً به شکل کیست نسجی یا اووسیست از راه دهان وارد بدن میزبان می شود. ارگانیزم های رها شده از کیست یا اووسیست به سلولهای روده ای هجوم برده به شکل تاکی زوئیت تکثیر می یابند. سرانجام سلولهای انگل دار متلاشی شده، تاکی زوئیت ها آزادگشته، سلولهای مجاور را مورد تهاجم قرار می دهند. تاکی زوئیت های خارج سلولی و آنهایی که درون لکوسیت ها قرار دارند از طریق جریان خون در سرتاسر بدن انتشار یافته و سلولهای بافتی مختلف بویژه سیستم رتیکولوآندوتلیال و اعصاب مرکزی را مورد تهاجم قرار می دهند. بیشتر مبتلایان فاقد علائم بالینی هستند و نسبت کمی از آنها علامت دارند. بیماریزایی توکسوپلاسم مربوط به مرحله حاد عفونت است یعنی مرحله ای که انگل به فرم تاکی زوئیت به سلول ها تهاجم برده و سبب تخریب سلولی می شود. مراحل حاد آن می تواند در بافت

های مختلف مانند مغز، غدد لنفاوی، کبد، قلب و چشم اتفاق افتد. در مرحله مزمن که انگل فقط به صورت کیست وجود دارد، هنوز به طور قطع بیماریزایی آن مشخص نشده است. هر چند به استناد نتایج مطالعات اپیدمیولوژی سال های اخیر، ممکن است توکسو پلازما در بروز برخی موارد بیماری های روان پریشی مثل اسکیزوفرنیا و یا صرع کریپتوژنیک نقش داشته باشد (1).

علائم بالینی: توکسوپلاسموز انسان را می توان در چهار شکل اکتسابی، مادرزادی، چشمی و بیماری در افراد دچار اختلال سیستم ایمنی توصیف کرد.

الف-توکسوپلاسموز اکتسابی: یافته های سرم شناسی نشان میدهد که توکسوپلاسموز اکتسابی تقریباً در 80 تا 90 درصد موارد در بالغین بدون علامت است. شایع ترین تظاهرات توکسوپلاسموز اکتسابی در افرادی که دارای پاسخ های ایمنی طبیعی هستند لنف آدنوپاتی است که معمولاً خوش خیم و خود محدود شونده است. تابلوی بیماری ممکن است شبیه منونوکلئوزیس عفونی همراه با تب، سردرد، درد عضلات، التهاب غدد لنفاوی و خستگی مفرط باشد (1).

ب- توکسوپلاسموز مادرزادی: در چهره بالینی توکسوپلاسموز مادرزادی عواملی مانند ویرولانس سویه انگلی، تعداد ارگانیسمی که از مادر به جنین منتقل می شود و دوره ای از حاملگی که مادر آلوده شده است، نقش دارند. ضایعات شدید دستگاه اعصاب مرکزی و چشم، مرده زایی و مرگ بعد از تولد معمولاً در نوزادانی دیده می شود که آلودگی آنها به توکسوپلازما در اولین یا دومین سه ماهه بارداری اتفاق افتاده است (1و2). توکسوپلاسموز مادرزادی متعاقب عفونت اولیه دوران بارداری اتفاق می افتد و حدود 30 تا 40٪ افرادی که در طی بارداری به عفونت اولیه توکسوپلازما آلوده می شوند، جنین با توکسوپلاسموز مادرزادی خواهند داشت. فراوانی انتقال مادرزادی با شدت توکسوپلاسموز مادرزادی رابطه عکس دارد. اکثر انتقال در اواخر بارداری است و عفونت های اواخر بارداری معمولاً بدون علائم آشکاری در نوزادان می

باشد و یا اینکه سبب علائم عمومی در نوزادان می شود. بسیاری از نوزادانی که در اوایل تولد بدون علامت آشکاری هستند در سال های بعد با فعال شدن انگل، ضایعات چشمی بروز می دهند. اثرات بینایی توکسوپلاسموز مادرزادی از کاهش دید و تاری دید تا کوری متفاوت است. در سه ماهه اول و دوم بارداری، جنین در معرض توکسوپلاسموز شدید است که می تواند اثرات مغزی و چشمی ماندگاری ایجاد کند و ندرتا ممکن باعث سقط شود. سه نشانه عمده توکسوپلاسموز مادرزادی هیدروسفالی یا میکروسفالی، کوریورتنیت و کلسیفیکاسیون مغزی است که به تریاد سابین نیز معروف است (1 و 2).

ج- توکسوپلاسموز چشمی: بیماری چشمی در بیشتر موارد بدنبال عفونتهای مادرزادی در دومین یا سومین دهه عمر بروز می کند. ضایعات بیشتر در قسمت خلفی چشم محدود می شود. این ضایعات ممکن است یک طرفه، دوطرفه با از بین رفتن شبکیه و مشیمیه و توام با فیروز پیشرفته باشد.

د- توکسوپلاسموز در افرادی که اختلال سیستم ایمنی دارند: توکسوپلاسموز که در میزبانهای طبیعی یک عفونت معمولی و در بیشتر موارد بدون علائم بالینی است، ممکن است بصورت یک عفونت حاد سیستمیک کشنده درآید. بیمارانی که به جهت ابتلا به نئوپلاسم سیستم لنفاوی (بهخصوص بیماری هوچکین)، بدخیمی های خونی یا برای جلوگیری از رد پیوند اعضا تحت درمان با داروهای سرکوب کننده ایمنی قرار می گیرند و بویژه مبتلایان به ایدز بیشتر در معرض ابتلا به توکسوپلاسموز حاد هستند. در بیش از 90 درصد بیماران ایدزی که به علت توکسوپلاسموز از پای در می آیند آنسفالیت دیده می شود. در افراد با اختلال عملکرد سیستم ایمنی توکسوپلاسموز یک فرصت طلب مهم است که می تواند تهدید کننده زندگی افراد باشد. متعاقب اختلال یا نقص ایمنی ممکن است راکتیویشن عفونت های نهفته توکسوپلاسماتفاقی افتد که در این موارد عمدتا توکسوپلاسموز مغزی بروز می کند و با ضایعات کانونی وسیع در مغز همراه

است. شایعترین تظاهر توکسوپلاسموز در بیماران مبتلا به ایدز آنسفالیت است که در فرم منتشره آنسفالیت توکسوپلاسمایی سیر بسیار پیش رونده ای دارد و در مدت کوتاهی باعث مرگ افراد می شود (1 و 2).

روشهای تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز: برای تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز بطور معمول از روشهای پارازیتولوژی (بافت شناسی و جداسازی انگل) برای جستجو و مشاهده عامل بیماری و روشهای سرولوژی جهت ردیابی و اندازه گیری پادتن های اختصاصی انگل استفاده می شود. در توکسوپلاسموز علائم کلینیکال اختصاصی نبوده و تشخیص آزمایشگاهی آن بسیار مهم است.

تشخیص بافتی: توکسوپلاسمارا می توان در نسوج و مایعات بیولوژیک یک میزبان پس از رنگ آمیزی با یکی از روشهای متداول در انگل شناسی و یا با تکنیک های ایمونوفلئورسانس جستجو کرد. ظاهر پاتولوژیک غدد لنفاوی در آلودگی به توکسوپلاسم تا حدی اختصاصی است ولی همواره متمایز کننده نیست.

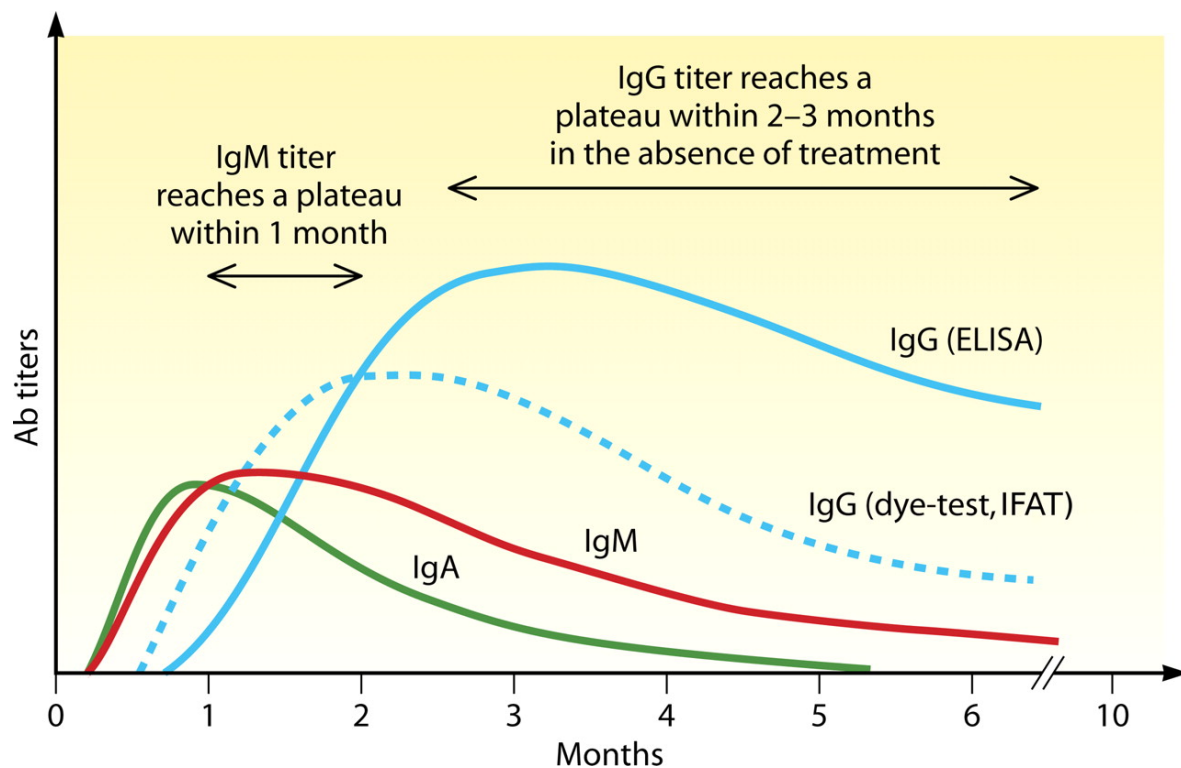
جداسازی توکسوپلاسم از خون و مایعات بدن: توکسوپلاسم گوندی ای را میتوان از هریک از مایعات بدنی یا نمونه های بافتی از طریق داخل صفاقی یا زیر جلدی به حیوان حساس آزمایشگاهی (موش سفید کوچک آزمایشگاهی یا هامستر) و یا کشت سلولی جدا کرد. جداسازی انگل از مایعات بدنی نشان دهنده مرحله حاد عفونت است، اما با جداکردن انگل از بافت هایی که بوسیله بیوپسی یا اتوپسی به دست آمده اند نمی توان مشخص نمود که انگل جدا شده مربوط به کدام مرحله (حاد یا مزمن) عفونت است. معایب روش جداسازی این است که زمانبر است و انجام آن در هر کجا امکان پذیر نیست (1).

آزمایشهای سرولوژیک: در تشخیص آزمایشگاهی توکسوپلاسموز ، جز در موارد ضروری کمتر از روشهای پارازیتولوژی استفاده میکنند، بلکه بطور معمول از آزمایشهای سرمی استفاده می کنند. روشهای متداولی که برای ردیابی و اندازه گیری پاتن های IgG و IgM توکسوپلاسم بکار می رود، عبارتند از :

آزمایش رنگی سابین فلدمن (Sabin-Feldman due test=DT)، فلئورسنت آنتی بادی غیرمستقیم (IFA)، تست آنزیمی ایمونواسی (ELISA)، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (IHA)، آگلوتیناسیون مستقیم (DA)، (MAT) (Modified Agglutination Test)، IgG avidity Test و Western Blot (1و2).

علیه توکسوپلاسمای انواع آنتی بادی IgG، IgA، IgE و IgM تولید می شود. IgM نخستین آنتی بادی است که تولید می شود که معمولاً در عرض کمتر از 1 هفته از آلودگی قابل تشخیص است و بعد از 2 هفته به حداکثر مقدار و بعد از 3 تا 4 ماه قابل تشخیص نیست. IgG با یک تاخیر چند روزه از IgM تولید می شود و بعد از حدود 2 تا 3 ماه به حداکثر رسیده و کاهش کند و تدریجی دارد و معمولاً سال های طولانی یا مادام العمر قابل تشخیص است. در تشخیص اولیه سرولوژیک توکسوپلاسموز این دو آنتی بادی به طور همزمان مورد سنجش قرار می گیرد. اثبات IgG ضد توکسوپلاسمای به تنهایی عفونت نهفته یا قبلی تلقی می شود ولی مثبت بودن هر دو آنتی بادی به احتمال قوی نشان دهنده عفونت اخیر است. آنتی بادی های IgE و IgA هم مثل IgM می توانند شاخص عفونت اخیر باشند. یک مشکل اساسی آنتی بادی IgM و IgA به عنوان شاخص عفونت این است که در برخی از افراد دوام این آنتی بادی در بیماران طولانی است و در مرحله مزمن هم قابل تشخیص هستند. به همین جهت تفکیک عفونت اخیر از قبلی را با مشکل مواجه می کند. در این موارد برای تشخیص دقیق تر از تست های تأییدی استفاده می شود که یکی از مهمترین تست های تأییدی IgG avidity است. اساس تست اویدیتی قوت اتصال آنتی بادی های IgG به آنتی ژن های توکسوپلاسمای می باشد. آنتی بادی هایی که در اوایل عفونت تولید می شوند اتصال آنها به آنتی ژن قوی نیست و به واسطه اوره آنتی بادی ها از آنتی ژن ها جدا می شوند. معمولاً بعد از 3 تا 5 ماه آنتی بادی هایی که تولید می شوند به قوت به آنتی ژن چسبیده و اوره قادر نیست اینها را از آنتی ژن

جدا کند. شاخص این تست Index avidity است که به صورت Low avidity ، high avidity و borden line گزارش می شود. در عفونت های اخیر (کمتر از 3 تا 5 ماه) نتایج تست Low avidity است و بعد از آن به سمت High avidity کشیده می شود. مشکل این تست این است در برخی از افراد Low avidity هم دوام طولانی داشته و در مرحله مزمن ممکن است نتیجه همین باشد به همین جهت امروزه در مراکز معتبر مثل CDC (Centers for Disease Control and Prevantion) پنلی از تستهای سرولوژی برای اشکال مختلف بالینی استفاده می شود. مهمترین کاربرد IgG avidity برای رد عفونت دوره بارداری در سه ماهه اول بارداری است. به عبارتی زنان بارداری که سه ماهه اول بارداری آزمایش شده و نتیجه آزمایش آنها High avidity است دلالت بر این دارد که عفونت آنها مربوط به پیش از بارداری است و خطری هم برای جنین وجود ندارد (1).



Kinetics of the antibody (Ab) response.

روش مولکولی یا **PCR (Polymerase Chain Reaction)**: از این روش برای تشخیص توکسوپلاسم در خون، مایعات بدن و بافتها استفاده می شود. تشخیص توکسوپلاسم در خون و مایعات نشان دهنده عفونت اخیر توکسوپلاسماست ولی نتایج مثبت PCR در نمونه های بافتی دلیل قطعی بر عفونت اخیر نیست. بیشترین کاربرد PCR در تشخیص توکسوپلاسموز مربوط به عفونت های مادرزادی و تشخیص آلودگی در جنین است. برای این منظور مایع آمنیون به روش PCR مورد آزمایش قرار می گیرد. گفته شده که PCR انقلابی در تشخیص توکسوپلاسموز مادرزادی ایجاد کرده است (1).

روش ایمونوپراکسیداز: این روش، روش مناسبی برای تشخیص توکسوپلاسموز در نمونه بیوپسی مغز در بیماران با آنسفالیت است که با این روش تاکی زوئیت ها قابل تشخیص می باشند (1).

کنترل و پیشگیری توکسوپلاسموز: برای کنترل توکسوپلاسموز پیشرفتهایی در زمینه تهیه واکسن انجام گرفته است، اما هنوز واکسنی که قدرت کنترل بیماری را داشته باشد در دست نیست. افرادی که سیستم ایمنی آنها اختلال ندارد، نیازی به پیشگیری بهداشتی ندارند، ولی پیشگیری برای زنان حامله سرم منفی و بیماران دچار نقص ایمنی و گیرندگان عضو پیوندی از اهمیت زیادی برخوردار است. برای از بین بردن کیست های نسجی انگل باید تمام قسمتهای گوشت قبل از مصرف حد اقل 60 درجه سانتی گراد حرارت دیده باشد و یا در منهای 20 درجه سانتی گراد منجمد گردد. افراد دچار نقص ایمنی و زنان حامله سرم منفی باید از خوردن فراورده های گوشتی خام یا کم پخته خودداری کنند. میوه و سبزی را از آنجاییکه ممکن است به اواسیست انگل آلوده باشند بایستی قبل از مصرف به خوبی و با دقت بشویند. کنترل گربه های ولگرد، کنترل سوسک وحشرات، تغذیه گربه های خانگی با غذای پخته، ممانعت از خروج گربه های خانگی از منزل و شکار پرندگان و جوندگان، تخلیه ظروف مدفوع گربه های خانگی بطور روزانه و

شستشوی آن با آب جوش و یا آمونیاک 10 درصد یا تتور ید 7 درصد از شیوع آلودگی جلوگیری می کند (2).

درمان توکسوپلاسموز: از آنجائیکه بیشتر موارد توکسوپلاسموز اکتسابی بدون علائم بالینی هستند معمولاً درمان هم نمی شوند. اکثر افراد سالم از نظر ایمنی به لطف آدنوپاتی توکسوپلاسمایی دچار می شوند بطور معمول نیازی به درمان خاصی ندارند. داروهایی که در درمان توکسوپلاسموز بکار میروند بشرح زیر است:

الف- پریمتامین (Pyrimethamin) یا داراپریم: پریمتامین همراه با سولفادیازین (Sulphadiazine) که به طور سینرژیسیم اثر می نمایند از داروهای انتخابی در درمان توکسوپلاسموز می باشند. این دارو ها باز دارنده متابولیسم فولات هستند و مانع سنتز اسید فولیک می شوند. هر دو دارو در غلظتهایی موثر وارد مایع مغزی - نخاعی می شوند. نیمه عمر پلاسمایی پریمتامین چهار روز و نیمه عمر پلاسمایی سولفادیازین ده تا دوازده ساعت است. پریمتامین تراتورژنیک است و در 20 هفته اول حاملگی منع مصرف دارد. طی این مدت برای زنان باردار اسپیرامایسین (Spiramycin) تجویز می شود. برای اجتناب از کریستالیزاسیون سولفادیازین در کلیه، باید در موقع مصرف آن با استفاده از مایعات فراوان برون دهی ادرار را افزایش داد. پریمتامین ممکن است باعث دپرسیون مغزاستخوان شود. از این رو شمارش گلبولها و پلاکت ها یک یا دو بار در هفته برای شناسایی آن (به ویژه در بچه ها) لازم است انجام گیرد. در مواردی که نقصانی در عناصر سلولی خون مشاهده شود، باید در برنامه دارویی بیمار اسید فولیک هم گنجانده شود (19).

ب- اسپیرامایسین، آزیترومایسین، کلاری ترومایسین و روکسی ترومایسین: اینها از آنتی بیوتیکهای ماکرولید هستند و مانع سنتز پروتئین بوسیله انگل می شوند تا اندازه ای موثرند. اسپیرامایسین برای درمان توکسوپلاسموز خانمهای حامله در اوایل بارداری داروی انتخابی است. این دارو وارد فضای مغزی-نخاعی

نمی شود، لذا از پیشرفت آنسفالیت های توکسوپلاسمایی در بیماران دچار اختلال سیستم ایمنی جلوگیری نمی کند (1).

ج- کلیندامایسین (Clindamycin): یک آنتی بیوتیک ضد باکتری است و به احتمال در مشیمیه تجمع پیدا می کند در درمان توکسوپلاسموز چشمی موثر است. نیمه عمر پلاسمایی آن دو تا سه ساعت است و به طور گسترده در بیشتر بافت ها و مایعات بدن بجز مایع مغزی-نخاعی منتشر میشود (1).

مرورری بر مکانیسم عمل داروهای توکسوپلاسم

داروی پریمتامین از طریق مهار آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز سبب تداخل در سنتز تترا هیدروفولیک اسید از فولیک اسید می شود. تترا هیدروفولیک اسید برای سنتز DNA و RNA در بسیاری از انواع موجودات زنده از جمله تک یاخته ها ضروری است. این دارو یک آنتاگونیست اسید فولیک بوده که به آسانی از لوله گوارش جذب می شود و محلول در چربی است. دارو به مایع مغزی-نخاعی نفوذ کرده و در بافت مغزی تمرکز می یابد که در درمان آنسفالیت اهمیت دارد. سولفادیازین نیز مهار کننده آنزیم دی هیدروپتیروات است که این آنزیم در سنتز اسید فولیک از پارا-آمینوبنزوئیک اسید نقش دارد. این دارو همانند سایر سولفانامیدها، تشکیل اسیدهای نوکلئیک ضروری بوسیله ی تک یاخته را مهار می کند. پریمتامین وقتی همراه یک سولفونامید (سولفادیازین) بکار رود، اثر تقویت کننده تا هشت برابر معمول خواهد داشت و لذا تجویز توام دو دارو در تمام موارد توصیه می شود. از آنجا که پریمتامین یک عامل ضد اسید فولیک است می تواند سبب کاهش شدید گلبول ها سفید و پلاکت ها گردد و بایستی بیمار تحت درمان، در هفته یکبار از نظر پلاکت ها، گلبول های سفید و قرمز مورد آزمایش قرار گیرد و دارو همزمان با اسید فولیک استفاده شود. پریمتامین باعث پوکی استخوان و اختلال در خون سازی می شود و در ضمن به علت ایجاد اثرات تراژونیک، تجویز این دارو در نیمه اول بارداری منع استعمال دارد. کلیندامایسین

باکتریواستاتیک است و به ریبوزوم های تک یاخته متصل شده و سنتز پروتئین را مهار می کند. تری متوپریم و پیریمتامین با اتصال به آنزیم دی هیدرو فولات ردوکتاز تک یاخته آنرا به صورت قابل برگشت مهار می کند. آزیترومایسین سنتز پروتئین را در تک یاخته مهار می کند و اتوواکون اثر مهاری در زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری دارد. محدودیت اصلی داروهای سنتتیک ضد توکسوپلازما عوارض جانبی آنهاست. به طوری که، ترکیب پیریمتامین و سولفونامید به ویژه در مبتلایان به اختلالات شدید سیستم ایمنی مانند بیماران ایدزی (تقریباً در 50٪ بیماران ایدزی) علائم مسمومیت شدید دارویی بروز می کند که منجر به قطع درمان می شود. سولفادیازین سبب بروز کریستالوری، هماچوری و واکنشهای ازدیاد حساسیت در افراد می شود. آزیترومایسین از ماکرولیدهای مشتق از اریترومایسین است که برای زنان باردار و بیماران جوان توکسیک است و نباید به مدت طولانی استفاده شود. اتوواکون به دلیل داشتن عوارض جانبی مانند سردرد، بثورات جلدی، بالا رفتن سطح آنزیمهای کبدی و محدودیت استفاده در زنان باردار به دلیل اثرات مضر دارو روی جنین، به مدت طولانی قابل استفاده نیستند. کلیندامایسین با داشتن اثرات جانبی از قبیل اسهال، تهوع، بثورات جلدی، نوتروپنی، اتوزینوفیلی، کاهش پلاکت های خونی محدودیت مصرف دارد (19،20).

مروری بر اهمیت گیاهان دارویی

در طب سنتی ایران و دیگر کشورها از دیرباز از انواع گیاهان دارویی برای درمان انواع بیماری ها استفاده شده است. معمولاً گیاهان دارویی دارای مجموعه ای از اثرات بر روی انواعی از بیماری ها می باشند. در زیر به اثرات انواع گیاهان دارویی در طب سنتی اشاره می شود. به طوری که از ریشه، برگ و سر شاخه های هوایی گیاه سرخارگل در درمان عفونت های قارچی، عوارض جانبی ناشی از اشعه درمانی، آرتريت روماتوئید، مسمومیت خونی، مسمومیت های غذایی، درمان زخم های چرکی، آبسه، تبخال، التهاب بافت های

پیوندی، زخم، سردرد اختلالات متابولیکی و همچنین در درمان حمایتی سرماخوردگی، عفونت های دستگاه تنفسی و ادراری به علت تحریک پاسخ ایمنی استفاده می شود. از ریزوم و ریشه ی خشک شده گیاه شیرین بیان در درمان گلو درد، سرفه، زخم های معده و اثنی عشر، سوئ هاضمه، واکنش های آلرژیک، روماتیسم، آرتریت، صرع، بی اشتهایی، آپاندیسیت، کزاز، دیفتری استفاده می شود. از گل های ماده مخروطی شکل گیاه رازک در درمان بی خوابی بخصوص اشکال در بخواب رفتن، کرامپ های شکمی، کم خونی، عفونت باکتریایی، درماتیت، اسهال، لکوره، میگرن، ادم، مسکن، ضد کرم، ضد تب، ضد نفخ، کمک به هضم غذا استفاده می شود. از برگ ها و میوه گیاه زیتون در درمان عفونت های گوناگون باکتریایی، ویروسی و قارچی و همچنین تب بر، قابض، ضد عفونی کننده پوست، مفید در درمان مالاریا، کاهنده فشار خون، مفید در درمان دیابت نوع دوم می باشد. عصاره برگ درخت گردو خاصیت میکروب کشی و باکتری کشی، در درمان سردرد، سرماخوردگی و بیماریهای پوستی بکار میرود. از روغن دانه های کرچک به عنوان مسهل، درمان مسمومیت های غذایی، ضد کرم، بر طرف کننده سوزش چشمی، درمان زگیل، درمان راش، جوش، کفگیرگ، آبسه استفاده می شود. از میوه رسیده و خشک شده نخل اره ای به عنوان مدر، درمان التهاب حنجره، بی اشتهایی، آلرژی، درمان سیاه زخم، سل، التهاب مثانه، گلودرد و ضد عفونی کننده مجاری ادراری استفاده می شود. دانه و اسانس رازیانه دارای خواص خلط آور، باد شکن، ضد میکروب، ضد التهاب و مدر میباشد (22).

گرایش به پژوهش بر روی گیاهان دارویی در ایران به طور قابل توجهی در دو سه دهه اخیر افزایش یافته است. این گرایش هم به شرایط اقلیمی مناسب کشور برای تکثیر و پرورش انواع گیاهان دارویی و هم پیشینه تاریخی طب سنتی در ایران مربوط می شود. تلاش هایی هم که در این زمینه در سال های اخیر در کشور انجام شده است به تولید فراورده های دارویی منتهی شده است که امروزه فرم تجاری آنها قابل

عرضه در داروخانه های کشور می باشد. داروهای گیاهی عمدتاً برای بیماری هایی استفاده می شود که استفاده از داروهای سنتتیک با محدودیت هایی روبروست.

مروری بر انواع گیاهان دارویی مورد استفاده برای درمان بیماریها در طب سنتی:

با توجه به اینکه مصرف داروهای صناعی با عوارض جانبی مختلفی همراه است، توجه به اهمیت گیاهان دارویی در درمان بیماریها پیوسته تاکید و تأیید می گردد. گیاهان دارویی دارای ساختمان پیچیده ای مشتمل بر سلولها و موادی از قبیل نشاسته، قند، پروتئین، آنزیم و چربی بوده و خاصیت درمانی آنها بر روی انسان به دلیل مواد فعال ساخته شده ی گیاهی است (22). معمولاً گیاهان دارویی دارای مجموعه ای از اثرات بر روی انواعی از بیماری ها می باشند. در زیر به اثرات انواع گیاهان دارویی در طب سنتی اشاره می شود. به طوری که از ریشه، برگ و سر شاخه های هوایی گیاه سرخارگل در درمان عفونت های قارچی، عوارض جانبی ناشی از اشعه درمانی، آرتريت روماتوئید، مسمومیت خونی، مسمومیت های غذایی، درمان زخم های چرکی، آبسه، تبخال، التهاب بافت های پیوندی، زخم، سردرد اختلالات متابولیکی و همچنین در درمان حمایتی سرماخوردگی، عفونت های دستگاه تنفسی و ادراری به علت تحریک پاسخ ایمنی استفاده می شود.

از سر شاخه های گلدار تازه یا خشک و نیز گل های تازه چای کوهی برای مصارف داروئی استفاده می شود. این گیاه دارای اثر ضد التهاب، ضد کرم و ضد اسهال چای کوهی را به عنوان یک گیاه آنتی سپتیک، مسکن و کمک به درمان زخمها گزارش نمودند گیاه چای کوهی به عنوان ضد التهاب، ضد کرم، ضد اسهال توسط افراد بومی مورد استفاده قرار می گرفت (23). گیاه مورد به عنوان ضد التهاب و ضد قارچ کاربرد داشته و همچنین در درمان بیماری های برونشیت، سینوزیت، اوتیت و اسهال مورد استفاده قرار میگیرد. همچنین دارای خواص ضد عفونی کننده، ضد ویروس و باکتری است (24). گیاه کاکوتی به عنوان ضد عفونی کننده

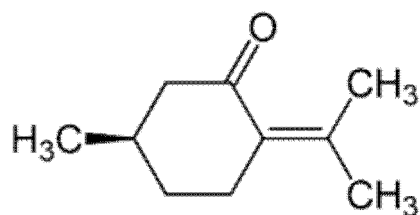
و همچنین درمان دیسانتری، عفونت های رحمی و بیماریهای تب دار استفاده می شود (25). اسطوخودوس گیاهی است که به عنوان گندزدا، کشنده باکتری، دافع کرم، ضد آسکاریس، حشره کش موثر بوده و در درمان زخمهای عفونی، سوختگیها، جرب، التیام نیش حشرات و مارها کاربرد داشته است (26). با توجه به گرایش روزافزون علمای پزشکی به استفاده از گیاهان در درمان بیماری ها، انجام تحقیقات جامع تری در داخل کشور ضروری می نماید. همچنین ضروری است تا فراورده های گیاهی از حالت سنتی به صورت قابل پسند و مطمئن در دسترس عموم قرارگیرند. بدیهی است گیاهان می توانند در بسیاری از موارد جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی باشند.

مروری بر گیاهان مورد مطالعه، خواص درمانی و ترکیبات تشکیل دهنده آنها

در این مطالعه، اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی، شامل گیاهان کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاد درخت و اسپند بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما در محیط *in vitro* و کشت سلول مورد ارزیابی قرار گرفت.

کاکوتی: با نام علمی *Ziziphora tenuiore* متعلق به تیره *Lamiaceae*، راسته *Lamiales*، زیر رده *Asteridae* و خانواده نعنائیان است. گیاهیست علفی، یک ساله با ساقه کوتاه به ارتفاع 5 تا 15 سانتی متر، برگهای آن باریک، نوک تیز با میان گره های کوتاه می باشد. گلها ی کوچک به رنگ بنفش کم رنگ یا بنفش مایل به ارغوانی دارد (27). جنس کاکوتی دارای 4 گونه *Z. capitata*, *Z. clinopodioides*، *Z. tenuior* و *Z. persica* میباشد و ترکیبات شیمیایی آن حاوی موادی از جمله پولگون *pulegone* (87٪)، تیمول *thymol* (4/3٪)، متا-2-انتول (5/31٪)، منتون *menthone* (4/46٪)، لیمون *limonene* (51/0 تا 7/8٪)، پیریتنون (12/19٪)، کارواکرول (5/10٪) و نئومنتون *neomenthone* (4/78٪) است. کاکوتی دارای اثرات ضد باکتری بسیار خوبی علیه باکتری های مولد فساد مواد غذایی از

جمله انتروباکتر آئروژنز، اشرشیاکلی، کلبسیلا، سالمونلا، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوک اورئوس و چند باکتری دیگر می باشد (28). پراکنش جغرافیایی گیاه کاکوتی، در ایران، ترکیه، روسیه، ترکمنستان، افغانستان، پاکستان، ماورای قفقاز و سیرری است (29). این گیاه به طور بومی در کشور ما عمدتاً در مناطق شمال، مرکز، شمال غرب، جنوب و شمال شرق ایران تولید می شود (30). عنصر اصلی در تعدادی از گیاهان خانواده نعنائیان از جمله کاکوتی، پولگون است. پولگون دارای خاصیت ضد باکتری و ضد قارچی است، به ویژه اینکه روی سوش های مختلف سالمونلا و کاندیدا آلبیکانس مؤثر می باشد (31). پولگون یک کتون میباشد که جزء مونوترپنها است. ترپنها قادر هستند که به غشای سلولی صدمه بزنند و در ساختار لیپید دیواره سلولی باکتریها نفوذ کنند که این امر منجر به دناتوراسیون پروتئینها و از هم پاشیدن ساختار سلولی و تراوش سیتوپلاسم و در نهایت مرگ سلول میشود (32).



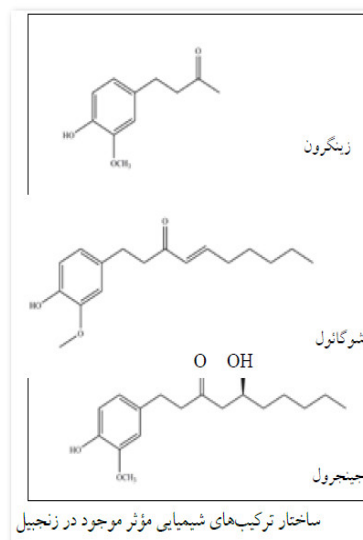
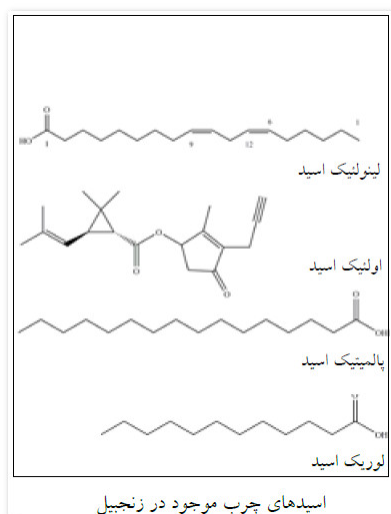
پولگون *(R)-5-Methyl-2-(1-methylethylidene)cyclohexanone*

اثرات درمانی کاکوتی: از برگ، گل و ساقه آن جهت مصارف درمانی استفاده می شود. گیاه کاکوتی به عنوان ضد عفونی کننده و همچنین درمان دیسانتری، عفونت های رحمی و بیماریهای تب دار استفاده می شود. همچنین خلط آور، بادشکن و مقوی معده است. در طب سنتی برای درمان برخی بیماریهای باکتریایی، قارچی و انگلی استفاده می شود (26).

زنجبیل: با نام علمی *zingiber officinale* از تیره زنجبیلیان و خانواده Zingiberaceae گیاه علفی ایستاده چند ساله با حدود ۷۰ گونه است. این گیاه به دلیل داشتن فلاونوئیدها دارای خواص آنتی اکسیدانی

وسیتو توکسیسیته و آنتی باکتریال بخصوص در عصاره متانولی می باشد(33). اثرات ضدالتهابی عصاره اتانولی زنجبیل در بیماری های التهابی حاد و مزمن از جمله آرتریت روماتوئید و دردهای استخوانی به اثبات رسیده است(34). این گیاه بومی آسیای جنوب شرقی است و در مناطقی همچون چین، هند و مکزیک یافت می شود. امروزه در بیشتر مناطق استوایی کشت می شود دارای خواص ضد قارچی، ضد باکتری و تسکین بخش بر روی دستگاه گوارش دارد(35). زنجبیل (زنجفیل) به عنوان گیاهی دارویی از زمان های دور کاربرد داشته است. چنانکه در عطاری های قرون وسطی جایگاه خاصی داشته و در درمان نفخ و تهوع مورد استفاده بوده است. کارشناسان طب هندی از آن به عنوان طلای طبیعی یاد کرده اند. کاربرد گسترده این گیاه نه تنها به خواص ضدقارچ و ضدباکتری آن وابسته است بلکه از اثر تسکین بخشی که بر دستگاه گوارش دارد، ناشی می شود. بخش اصلی مورد استفاده زنجبیل، ساقه زیرزمینی آن است که ریزوم نامیده می شود. ساقه های هوایی گیاه که به طور عمودی از ریزوم خارج می شوند، حامل برگ های پهن و گل های زرد رنگ گیاه اند. حدود 50 تا 70 درصد زنجبیل را انواع قندها تشکیل می دهد و مقدار اسیدهای چرب که به شکل آزاد یا ترکیب در آن وجود دارند به 3 تا 18 درصد میرسد(36).

شکل زیر، ساختار و فرمول شیمیایی اسیدهای چرب موجود در زنجبیل را نشان می دهد.



در بخش های زیرزمینی زنجبیل، 1 تا 3 درصد اسانس روغنی فرار وجود دارد که ترکیب هایی مانند کامفن، فلاندرن، زیجی برن، سینثول، سیترال و بورنئول را دربرمی گیرد. بوی تند و اثرهای اصلی زنجبیل ناشی از وجود اولئورزین هایی همچون gingerol، جینجرول، shogaol، شوگائول و zingron زینگرون است که حدود 4 تا 7/5 درصد گیاه را تشکیل می دهند. مزه تند و سوزش آور این گیاه نیز از شوگائول و جینجرول نتیجه میشود. آمینواسیدها، پروتئین، مواد معدنی و ویتامین هایی همچون ویتامین A، از دیگر مواد موجود در گیاه زنجبیل اند. منیزیم و منگنز موجود در زنجبیل به تنظیم قندخون در افراد مبتلا به بیماری دیابت نوع 2، کمک میکنند (36).

اثرهای درمانی زنجبیل: پیشگیری از سرطان روده، پروستات و سرطان تخمدان، کاهش فشارخون و تسکین دردهای میگرنی. به تازگی مشخص شده است که زنجبیل می تواند در کاهش فشارخون سودمند باشد. در حالیکه فشارخون بالا می تواند به بیماری های قلبی، نارسایی کلیه و سکته بینجامد. مواد موجود در زنجبیل با جلوگیری از تشکیل رسوب کلسیم در درمان و پیشگیری از بیماری های کلیه مؤثر واقع می شود، با تحریک گردش خون احتمال سکته های قلبی و مغزی را کاهش می دهد و از فشارخون میکاهد. زنجبیل منبعی از ویتامین ها از جمله ویتامین B6، مواد معدنی مانند پتاسیم و منیزیم است که در برابر بیماری های قلبی از انسان حمایت میکند. به نظر می رسد وجود این مواد است که با جلوگیری از گرفتگی رگ ها کاهش فشارخون را در پی دارد و از لخته شدن خون جلوگیری میکند (36).

برگ گردو: با نام علمی *Juglans regia* از خانواده *Juglandaceae* درختی است زیبا و دارای برگهای مرکب از برگچه های فرد و بزرگ، می باشد. 21 گونه دارد و دارای میوه ی خوراکی می باشد. اثرات ضد میکروبی و ضد باکتریایی عصاره برگ گردو بر روی باکتری های گرم مثبت مثل باسیلوس

سرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و همچنین باکتری های گرم منفی مثل اشریشیا کلی، پseudomonas آئروژینوزا و کلبسیلا پنومونیا ثابت شده است (26,38). برگ گردو دارای دو گروه عمده ترکیب های فنلی کافئوئیلوینیک اسید و کوماروئیلکوینیک اسید می باشد. عصاره برگ گردو دارای ترکیبات مختلف از جمله تانن، اولئوروپین (Oleuropein)، کورستین 3-گالاکتوزید (Quercetin 3-galactoside)، کورستین 3-آرابینوزید (Quercetin 3-arabinoside)، فلاون ها، فلاونویدها و اسید کوماریک است (39). فلاونول ها که ساختمان فنولی داشته و اثرات ضد میکروبی آنها احتمالاً ناشی از ترکیب پروتئین های خارج سلولی و یا تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی و یا ایجاد اختلال در غشای سلول میکروارگانیسم هاست (38,40). کاتشین یکی از فلاونوئیدهای برگ گردو است که در چای سبز نیز موجود بوده و خاصیت ضد میکروبی چای سبز نیز به همین ماده نسبت داده می شود (38).

اثرات درمانی برگ گردو: برگ گردو به طور گسترده در طب سنتی برای درمان بیماری های مزمن استفاده می گردد. همچنین دارای خاصیت ضد سرطانی، تصفیه کنندگی خون و آنتی اکسیدانی است. از پوست درخت گردو و همچنین پوست سبز گردو به عنوان ماده ای قابض، درمان درد و ورم مفاصل و همچنین شستشو و التیام زخمها و بیماری سل استفاده می شود (26).

آزاد درخت: بانام علمی *Melia azedarach* از خانواده *Meliaceae* که در طب سنتی از خواص آنتی باکتریال و ضد سرطانی آن در درمان بیماریها استفاده می شود و در جنوب شرقی آسیا (هند، پاکستان و ایران) یافت میشود (41). از برگ، گل، دانه، میوه و شاخه های جوان این درخت برای درمان مالاریا، دیابت، سرفه های مزمن و بیماری های پوستی استفاده می کنند (42). آزاد درخت درختی است زیبا به ارتفاع 10 تا 15 متر که برگهای آن به طول 20 تا 30 سانتی متر و مرکب از 5 یا 7 برگچه نوک تیز و دندانه دار است.

گل‌هایی معطر به رنگ آبی مایل به بنفش و مجتمع به صورت خوشه مرکب، به طول 20 سانتی متر (حداکثر) دارد (43). ترکیبات موجود در عصاره برگ آزاد درخت که باروش کروماتوگرافی شناخته شده شامل 48 ماده می باشد که بطور مثال به چند تا از آنها اشاره می کنیم: هیدروکسی بنزوئیک اسید p-(hydroxybenzoic) acid، اسید کوماریک (p-coumaric acid)، فلاونوئیدها (flavonoid)، اسید فنلیک (phenolic acid)، اسیدکوماریک، فیتواستروئولهای گیاهی (Diterpene,alkane)، hydrocarbon phytosterols، ویتامین E، (Tri-trepen vitamin-E) و اسید آلکانوئیک (alkanoic acid) (42).

خواص درمانی: از پوست آن، به عنوان مقوی، نیرودهنده، قابض، تب بر، ضداسکوربوت و ضد کرم استفاده می شود. در استعمال خارجی، برگ آن بمنظور مداو ابر روی زخم ها و اولسرها گذاشته می شود و یا آنکه له شده آن را به محل دردناک عضو در روماتیسم جهت تسکین درد، اثر می دهند (43). در طب سنتی به اثرات ضد کرم، ضد میکروبی، ضد مالاریا، ضد درد، ضد ویروسی و ضد سرطانی این گیاه اشاراتی شده است (44). محل رویش این درخت درایران نواحی شمالی ایران، گیلان: لاهیجان، تهران، مازندران: ایستگاه تیرتاش، نور، بندرعباس و مکران است. این درخت از خارج وارد ایران شده و در بندرعباس و چابهار می روید نام محلی آن در نواحی مذکور، چریش، سریش و چریشک می باشد (45).

اسپند: با نام علمی (Peganum harmala) خانواده Zygophyllaceae از گیاهان محلی است که در اکثر مناطق کوهستانی وجود دارد این گیاه در مناطق مدیترانه ای شمال آفریقا، ترکیه، سوریه می روید. در ایران نیز در حاشیه کویر راه تهران قم، اصفهان، تهران، قزوین، رستم آباد، رودبار، اطراف کرج، بوشهر، ازنا، جاده تفرش و بعضی نواحی دیگر به طور خودرو دیده می شود. این گیاه معمولا در اراضی بایر می روید و

بصورت خوراکی و دارویی در مناطقی از کشور استفاده می گردد. پگانوم هارمالا درواقع همان حرمل در کتب طب سنتی ایران است (46).

خواص درمانی : حرمل یا اسپند دارای خواص ضد میکروبی و اثرهای ضد قارچی و ضدسرطانی است. به علاوه دارای خاصیت ضد کرمی بوده و برای پروتوزوئرها سمی است (47). از عصاره این گیاه در درمان بیماریهای پوستی مثل: لیشمانیازیس، ایمپتیگو، پیتیریاژیس و التهابات طبیعی پوست استفاده می شود (48). دانه این گیاه در خانه سوزانده می شود و دود غلیظ آن برای ضد عفونی هوا ، دور کننده حشرات، خوشبوکننده فضا و به باور برخی حتی خنثی کردن چشم زخم و... مورد استفاده قرار می گیرد. دانه اسفند دارای الکولوئیدهای نظیر: Harmin، هارمالین Harmalin، هارمالون Harmalon است. هارمالین از نظر درمانی دارای اثر نیرو دهنده سیستم مرکزی اعصاب و ماده ای سمی است ضد انگل و خواب آور است، به عنوان تب بر و برای درد معده تجویز می شود، انواع کرم نواری روده را از بین می برد.



Peganum harmala



ziziphora tenuior



Melia azedarach



Juglans regia



Zingiber officinale

تصاویر گیاهان مورد مطالعه

مروری بر آزمایش MTT، اساس تست و کاربرد آن:

[3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide =(MTT)]

از تست MTT جهت تعیین رشد سلولی، اثر سیتوتوکسیسیته دارو و حساسیت دارویی استفاده می شود. در بعضی مواقع از این روش صرفاً جهت تعیین و مقایسه مقدار رشد سلول در محیط های مختلف استفاده می شود. اساس این تست تبدیل ماده MTT با نام علمی 3-4,5-دی متیل -2-تiazول به کریستال فورمازان است. که مقدار تولید شده این ماده حاکی از فعالیت میتوکندری در سلول های زنده است. در نتیجه مقدار تبدیل این ماده نسبت مستقیمی با تعداد سلول های زنده دارد. این روش بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول های زنده استوار است که MTT قادر به عبور از غشای سلولها میباشد. پس از ورود MTT به سلولهای سالم، حلقه تترازولیوم آن را می شکند و آن را به کریستال های نامحلول فورمازان تبدیل می کند. حاصل آن تغییر رنگ از زرد به بنفش می باشد. در حالی که در سلولهای مرده این واکنش صورت نمی گیرد. جذب نوری (Optical Density=OD) این کریستال ها بعد از حل کردن در DMSO (dimethylsulfoxide) با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر در مقایسه با گروه های کنترل قرائت می شود. این نوع اندازه گیری در محیط برون تنی و در پلیت های سلولی 96 چاهکی کشت سلولی قابل انجام می باشد. در این آزمایش می توان کریستال های فورمازان را با حلال های مختلف حل نمود و مقدار جذب نوری آن را با استفاده از دستگاههای کالریتر در دو طول موج 570 و 630 نانومتر به صورت کمی اندازه گیری کرد. مقدار OD مربوط به سلول های در معرض دارو نسبت به مقدار آن در سلول های مواجهه نشده با دارو نشانه ی نسبت زنده بودن سلول ها در محیط حاوی دارو است. تهیه سریالی از غلظت دارو در چاهک ها و ارزیابی مقادیر زنده بودن سلول نسبت به گروه کنترل و پیاده کردن این مقادیر بر روی نمودار در بدست آوردن استاندارد به نام Effective (Concentration) EC50 یعنی غلظتی از ماده که باعث جلوگیری از رشد نیمی از ارگانسیم های مربوطه می گردد، استفاده می شود. در مورد سلول های غیر قابل رشد و تقسیم از استاندارد دیگری به نام (Lethal dose LD50) یعنی غلظتی از ماده که باعث مرگ از نیمی از ارگانسیم های مربوطه می گردد استفاده می شود.

فصل دوم

بیان مسئله

مرور متون

اهداف و فرضیات

بیان مسئله: توکسوپلازما انگل پیچیده ای است و از محدود انگل هایی است که هنوز ناشناخته های زیادی دارد. این انگل جزء چند انگلی است که بیشترین تحقیقات انگل شناسی را به خود اختصاص داده است. یکی از مشکلات اصلی توکسوپلاسموز، محدودیت های درمانی آن است. داروهای فعلی ضد توکسوپلازما علاوه بر اینکه اثرات سوء جانبی دارند، قادر به از بین بردن انگل های داخل کیست ها و ریشه کنی عفونت نیستند. درمان انتخابی توکسوپلاسموز ترکیب سینرژیک پیریمتامین و سولفونامید است. پیریمتامین موثرترین داروی ضد توکسوپلازماست. پیریمتامین آنتاگونیست فولیک اسید است و با مهار آنزیم دی هیدرو فولات ردوکتاز سبب بلوکه شدن بیوسنتز پورین ها و پریمیدین ها می شود که اینها برای سنتز DNA و تکثیر سلولی نیاز هستند. سولفادیازین از سولفانامیدهاست و به دلیل شباهت ساختمانی با پارا-آمینوبنزوئیک اسید (PABA) به طور رقابتی آنزیم دی هیدروپتروات سنتتاز انگل را که مسئول تبدیل PABA به اسید دی هیدروفولیک است، مهار می کند. این امر در نهایت منجر به وقفه در ساخت پورین ها، تیمیدین و DNA می گردد. کلیندامایسین، داپسون، اتوواکون و آزیترومایسین نیز داروهای آلترناتیوی هستند که برای درمان توکسوپلاسموز در ترکیب با پیریمتامین استفاده می شوند. داپسون، احتمالاً مشابه سایر سولفانامیدها سبب مهار سنتز دی هیدروفولیک اسید می شود. کلیندامایسین از طریق اتصال به ساب یونیت S50 ریبوزومال، سنتز پروتئین را مهار می کند (19,20). اتوواکون از دسته نفتوکینون ها و با فعالیت وسیع الطیف آنتی پروتوزوایی است که آنالوک ساختمانی ubiquinone تک یاخته هاست که این یک پروتئین میتوکندریایی درگیر در زنجیره انتقال الکترون است. برای درمان زنان باردار اسپیرامایسین توصیه شده است که اثر اصلی آن کاهش انتقال مادرزادی تاکی زوئیت هاست (49).

محدودیت اصلی داروهای سنتتیک ضد توکسوپلازما عوارض جانبی آنهاست. شایع ترین اثر جانبی پیریمتامین، ساپرسیون مغز استخوان است. سایر اثرات جانبی آن شامل، اختلالات گوارشی، سردرد، راش و

احساس بوی بد دهان است. شایع ترین اثرات جانبی سولفادیازین، راش های پوستی و نفروتوکسیسیتی ناشی از کریستالوری است. واکنش های جانبی کلیندامایسین شامل راش، تهوع، استفراغ و اسهال می باشد. میوپاتی با اختلالات الکترومیوگرافی و افزایش کراتین فسفوکیناز نیز برای این دارو گزارش شده است. آتوواکون به دلیل داشتن عوارض جانبی مانند سردرد، بثورات جلدی، بالا رفتن سطح انزیمهای کبدی محدودیت استفاده دارد و در زنان باردار به دلیل اثرات مضر دارو روی جنین به مدت طولانی قابل استفاده نیست (19). با توجه به محدودیت های داروهای سنتتیک ضد توکسوپلازما محققین به دنبال دستیابی به داروهایی هستند که علاوه بر اثربخشی بیشتر، اثرات جانبی کمتر داشته باشند. یکی از اهداف دارویی، داروهای با منشاء گیاهی است.

گیاهان دارویی از گذشته های دور در تمدن های کهن مثل ایران، یونان، چین و هند برای درمان انواع بیماری مورد استفاده قرار می گیرند. محدودیت های درمانی برخی داروهای سنتتیک و مقبولیت داروهای با منشا گیاهی به دلایلی چون کمتر بودن عوارض جانبی، پذیرش بهتر بیمار به علت توصیه طب سنتی، ارزاتر بودن گیاهان دارویی و همچنین سازگاری بهتر با عملکرد فیزیولوژیک بدن سبب شده است تا گرایش به استفاده از گیاه درمانی و داروهای با منشا گیاهی در سالهای اخیر افزایش یابد.

در کشور ما نیز گرایش روزافزونی به استفاده از گیاهان دارویی یا فراورده های آنها برای درمان یا پیشگیری بیماری ها مشاهده می شود که می تواند به دو دلیل عمده باشد. نخست پیشینه تاریخی مثبت طب سنتی در ایران است که برای بسیاری از مردم اطمینان بخش است. دوم آنکه پژوهش های سال های اخیر در ایران به تولید فراورده هایی از گیاهان دارویی منتهی شده است که امروزه به صورت فراورده های تجاری موثر و قابل پسند در داروخانه های کشور قابل دسترس هستند.

کشور ما قابلیت بالایی برای تحقیق و تولید داروهای گیاهی دارد که این به تنوع اقلیمی و پتانسیل علمی ایران مربوط می شود. در اقلیم های مختلف کشور انواع گیاهان دارویی به طور خودرو یا پرورشی رشد و تکثیر می یابند. از طرف دیگر، در سال های اخیر تعداد قابل توجهی محقق در کشور تربیت شده است که همسو با گرایشات جهانی در زمینه گیاهان دارویی کار می کنند. ضمناً، سیاست های کشوری در زمینه حمایت از پژوهش های تولید محور به این نوع پژوهش ها سرعت بخشیده است.

از شگفتی های گیاهان دارویی آن است که اینها دارای ترکیبات گوناگون با اثرات درمانی مختلفی می باشند، به طوری که در طب سنتی برای انواع گیاهان دارویی اثرات مختلف درمانی اشاره شده است که یکی از آنها اثرات ضد انگلی و ضد عفونی کنندگی است. انگل ها نیز انواع متفاوتی هستند که اثرات گیاهان دارویی بر آنها می تواند متفاوت باشد. اثرات ضد انگلی در طب سنتی عمدتاً مرتبط با کرم هاست، چونکه کرم های بالغ انگل های ماکروسکوپی اند و ارزیابی اثرات ضد کرمی گیاهان دارویی از طریق دفع آنها از گذشته های دور قابل تشخیص بوده است. در مورد برخی بیماری های تک یاخته ای نیز به ویژه مالاریا و سالک از گذشته های دور از برخی ترکیبات گیاهی برای درمان آنها استفاده می شود ولی در مورد توکسوپلاسموز اشاراتی در طب سنتی وجود ندارد، چونکه این بیماری انگلی حدود یک قرن است که شناسایی شده است.

مطالعات محدودی در سال های اخیر در زمینه اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها و فراکشن های گیاهی انجام شده است که نشان می دهد برخی عصاره ها و فراکشن های گیاهی فعالیت ضد توکسوپلاسمایی خوبی دارند (50-60). همچنین، ما در یک مطالعه مقدماتی نشان دادیم که برخی از عصاره های گیاهان دارویی بومی ایران بر تاکی زوئیت های توکسوپلاسم اثر کشندگی دارند. بر پایه این یافته مقدماتی، مطالعه حاضر طراحی شد که در آن اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره اتانولی چند گیاه دارویی بومی ایران شامل

کاکوتی، زنجبیل، آزاد درخت، برگ گردو و اسپند بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما در محیط *in vitro* مورد ارزیابی قرار گرفت.

اهداف و فرضیات:

الف-هدف اصلی (General Objective)

تعیین اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاد درخت و اسپند در محیط کشت سلولی

تعیین اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاد درخت و اسپند در محیط برون تنی عاری از سلول

ب-اهداف فرعی (Specific Objective)

تعیین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره های گیاهان کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاد درخت و اسپند در محیط برون تنی عاری از سلول بر حسب دوز عصاره ها

تعیین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره های گیاهان کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاد درخت و اسپند در محیط برون تنی عاری از سلول بر حسب مدت زمان انکوباسیون

تعیین EC_{50} عصاره های گیاهان کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاد درخت و اسپند در مهار توکسوپلازما در کشت سلولی

تعیین Selectivity عصاره های گیاهان کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاد درخت و اسپند در مهار

توکسوپلازما در کشت سلولی

ج-اهداف کاربردی (*Applied Objectives*):

هدف کاربردی اولیه: شناسایی عصاره های گیاهان بومی ایران با خاصیت ضد توکسوپلاسمایی

هدف کاربردی آتی: شناسایی اجزای ضد توکسوپلاسمای در فراکشن ها.

د-فرضیات (*Hypothesis*) یا سوال های پژوهش:

عصاره های گیاهان کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاد درخت و اسپند دارای اثرات ضد توکسوپلاسمایی می باشند.

مرور متون

مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه اثرات ضد میکروبی و ضد انگلی گیاهان دارویی:

مطالعات متعددی در زمینه اثرات ضد میکروبی و ضد انگلی گیاهان دارویی انجام شده است که در زیر به تعدادی از آنها اشاره می شود: در مطالعات Kheiri Manjili و همکاران (2012)، اثر ضد لیشمانیایی عصاره اتانولی گیاه زنیان (*Carum copticum heirm*) (61)، Ramazani و همکاران (2010)، اثر ضد مالاریایی افسنتین (*Artemisia absinthium L.*) (62)، Santos و همکاران (2010)، اثر ضد لیشمانیایی بومادران (63)، Orhan و همکاران (2013)، اثر ضد تریپانوزومی چای کوهی (*Hypericum perforatum*) (64)، El-Ansary AK و همکاران (2007)، اثر ضد شیسستوزومایی زردچوبه (*Curcuma longa*) (65)، Naghibi و همکاران (2013)، اثر ضد مالاریایی مورد (*Myrtus communis L.*) (66)، Burt و همکاران (2013)، اثر ضد ایمریا سرخارگل (*Echinacea purpurea*) (67)، Mojarab و همکاران (2014)، اثر ضد مالاریایی درمنه کوهی (*Artemisia aucheri Boiss*) (68)، Ziegler و همکاران (2004)، اثر ضد مالاریایی آویشن (*Zataria multiflora Boiss*) (69)، Sarac و Ugur (2009)، اثر ضد باکتریایی کاکوتی (*Ziziphora*)

Zingiber (70)، Kaushik و همکاران (2013)، اثر ضد مالاریایی زنجبیل (Zingiber officinale) (71)، Cala و همکاران (2012)، اثر ضد نماتدی آزاددرخت (Melia azedarach L.) (72)، Rahimi-Moghaddam و همکاران (2011)، اثر ضد لیشمانیایی اسپند (Peganum harmala) (73)، Ankrah و همکاران (2003)، اثر ضد مالاریایی قوزه پنبه (Gossypium hirsutum) (74)، Serakta و همکاران (2013)، اثر ضد لیشمانیایی برگ گردو (Juglans regia) (75) و Vendrametto و همکاران (2010)، اثر ضد لیشمانیایی ترکیبی از برگ فلفل (Piper regnellii) (76) نشان داده شده است.

که به نتایج برخی از آنها در زیر اشاره می شود.

مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه اثرات ضد میکروبی و ضد انگلی گیاهان مورد مطالعه:

بررسی های متعددی روی گیاه کاکوتی انجام شده است. Adams و همکاران (2011) با یک مطالعه مروری گزارش نمودند که بعضی گیاهان دارویی از جمله کاکوتی می تواند منبع با ارزشی برای درمان پلاسمودیوم ها باشند (77). Hammer و همکاران (1999) فعالیت ضد باکتریایی گیاه کاکوتی را مورد بررسی قرار دادند و مشاهده نمودند که این گیاه دارای اثر ضد باکتری خوبی است (78). در مطالعه Rota و همکاران (2004) در اسپانیا مشخص شد که کاکوتی دارای اثر ضد باکتریایی است (79). شکری و همکاران (2012) خواص ضد کاندیدیایی برای کاکوتی گزارش نمودند (80). صالحی و همکاران (2005) اثر فراکشن های *Z. clinopodioides* را بر روی باکتری ها آزمایش کردند و متوجه شدند که این گیاه دارای اثر قابل ملاحظه ای بر روی باسیلوس سوبتیلیس، اشیشیاکلی و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس می باشد (81). در بررسی Suhad و همکاران در سال 2012 خواص ضد باکتریایی گیاه زنجبیل بر روی باکتریهای پاتوژن اثبات شده است (84). در مطالعه Gaus و همکاران در سال 2009 نشان داده شد که عصاره زنجبیل قادر است باکتری هلیکوباکتر را در حیوانات آزمایشگاهی مورد مطالعه $IC_{50} = 8/5$

$\mu\text{g/mL}$ از بین برد و عوارض ناشی از عفونت را کاهش دهد (85). در بررسی Abu Taha و همکارانش در سال 2011 به اثرات ضد کرمی، ضدقارچی، ضدباکتری، ضدویروسی، ضدالتهابی، ضد کانسر و کاهش دهندگی قند و کلسترول خون عصاره برگ گردو، در یک مقاله رویویی اشاره شده است (87). در مطالعه خلیلی دهکردی و همکاران (2011) عصاره گیاهان افسنتین، بومادران و برگ گردو به طور معنی دار سبب کاهش تعداد تریکوموناس در محیط کشت شد (88). در مطالعه براتی و همکاران (1389) عصاره های گیاهی آویشن شیرازی، اسپند و مورد به صورت برون تنی اثرات ضد لیشمانیایی (مهار پروماستیگوت های لیشمانیا ماژور) خوبی داشتند (89). در مطالعه ای که توسط آستولا و همکاران در سال (2008) گزارش شد عصاره الکلی دانه های اسپند در موشهای رت دارای اثر مهار کنندگی بر پلاسمودیم فالسی پاروم بود (90). در مطالعه مشرقی و همکارش در سال 2012 اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی اسپند بر باکتری اشیریشیا کولی اثبات شد که در این مطالعه بهترین غلظت ممانعت کننده برای رشد باکتری 0/3 میلی گرم در میلی لیتر بود (91). در مطالعه یوسفی و همکارانش در سال 2009 غلظت موثره عصاره اسپند بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا در محیط کشت سلولی ماکروفاژهای آلوده $40 \mu\text{g/ml}$ بدست آمد (92). در سال 2007 Marwa و همکارانش اثرات پروتواسکلوکسیدال عصاره اتانولی اسپند را در مقایسه با داروی شیمیایی مبندازول بررسی کردند و اثر کشندگی عصاره را بر میزان وایابلیتی پروتواسکلوکسیدال ثابت کردند (94). در مطالعه بابایی پور و همکارانش (2012) اثر harmaline و harmine را در عصاره اسپند بررسی کردند و دریافتند که در غلظت 200 و 100 میلی گرم بر میلی لیتر بعد از 80 دقیقه، غلظت 50 بعد از 100 دقیقه و در غلظت 25 میلی گرم بعد از 120 دقیقه اثر کشندگی برلارو *Protostrongylus rufescens* را دارد (95). در مطالعه Ramya و همکارانش در سال 2009 که بر روی انواع عصاره های مختلف آزاد درخت انجام دادند به اثرات آنتی باکتریایی این گیاه پی بردند و دیدند عصاره متانولی این گیاه بیشترین اثر را روی باسیلوس سوبتیلیس دارد و بیشترین هاله ممانعت از رشد

مربوط به این باکتری است. علاوه بر آن عصاره اتانولی برگ این گیاه روی رشد باکتری گرم منفی مثل اشیشیا کولی و پروتئوس آئروژینوزا بیشترین اثر ممانعت از رشد را دارد (97). در بررسی Zahoor و همکارانش که بر روی عصاره های مختلف آزاد درخت انجام دادند به اثرات ضد باکتری و آنتی اکسیدانی این گیاه پی بردند و متوجه شدند این گیاه بر روی باکتریهای پروتئوس میرابیلیس، انتروباکتر آئروژینوزا و سودوموناس آئروژینوزا اثرات ممانعت کنندگی در رشد دارد (98). در تحقیق Meziane (2014) که به منظور پی بردن به خواص ضد باکتری و ضدقارچی عصاره اتانولی برگ درخت آزاد درخت انجام دادند، هاله ی ممانعت از رشد باکتری ها به ترتیب برای استافیلوکوکوس اورئوس، انترو باکتر آئروژینوزا و اشیشیا کولی به ترتیب: 30 میلی متر، 25 و 23 میلی متر بدست آمد. این اثر برای کانیدیدا آلبیکنس *C. albicans* ، ساکارو مایسس *Saccharomyces* و فوزاریوم اکسیس پوریوم *F. oxysporum* نیز قابل توجه بود (100).

مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه شناسایی ترکیبات ضد میکروبی و ضد انگلی گیاهان دارویی: مطالعات متعددی در زمینه شناسایی ترکیبات عصاره های گیاهی و اثرات ضد میکروبی و ضد انگلی این ترکیبات انجام شده است که در زیر به تعدادی از آنها اشاره می شود:

توکلی و همکاران (1390) طی تحقیقی اعلام کردند در اسانس کاکوتی ترکیبات مختلفی از جمله پولگون (pulegone) وجود دارد (82). و در تحقیقات دیگری فعالیت های آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانی و ضد قارچی روغن اصلی گیاه کاکوتی را مربوط به pulegone (پولگون) دانستند (83). در مطالعه ای که در سال 2013 توسط Santos و همکارانش بر روی عصاره متانولی برگ گردو انجام شد اثرات آنتی اکسیدانی و آنتی توموری این عصاره بدلیل ترکیبات فنلی و آلفا توکوفرول مورد بررسی قرار گرفته و همچنین به اثرات التیام بخشی آن بر زخم های پوستی و سوختگیها و اثرات ضد انگلی و ضد اسهالی آن اشاره شده است (86). در بررسی Chabir و همکارانش در سال 2014 که بر روی ترکیبات دانه اسپند از

جمله *anthocyanins* و *total phenolics, flavonoids, tannins* مطالعه کردند، به اثرات ضدسرطانی، ضد مالاریایی و آنتی اکسیدانی این گیاه پی بردند و دیدند که عصاره اتانولی اسپند بیشترین اثر ضد مالاریایی را روی سویه های پلاسمودیوم فالسی فاروم مقاوم به کلروکین را داراست $IC_{50}=23$ mg/L. برای سلولهای سرطانی سینه این مقدار $IC_{50}=32$ mg/L و برای رادیکالهای آزاد $IC_{50}=19.09\pm3.07$ mg/L گزارش کردند و دریافتند که بیشترین اثر ضد مالاریایی این گیاه به دلیل ترکیبات *total phenolics* می باشد (96). در مطالعه Sultana و همکارانش در سال 2013 که بر روی عصاره هیدرومتانولی برگ آزاد درخت و در خرگوش ها انجام دادند به دلیل وجود ترکیبات: *alkaloids, tannins, saponins, flavonoids*، به اثر *antipyretic* (ضد تب) در آن پی بردند (99).

مروری بر مطالعات انجام شده در زمینه اثرات ضد توکسوپلاسمایی گیاهان دارویی: تا حال حاضر به استناد گزارشات بدست آمده از بانک های اطلاعاتی به ویژه PubMed، حدود 10 مطالعه در زمینه اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی و یا فراکشن های آنها منتشر شده است که نتایج آنها در زیر اشاره می شود:

در مطالعه Youn و همکاران (2003) فعالیت ضد توکسوپلاسمایی 5 عصاره الکلی گیاهی شامل *Torilis japonica*, *Pulsatilla koreana*, *Sinomenium acutum*, *Sophora flavescens* و *Ulmus macrocarpa* بر تاکی زوئیت های توکسوپلاسمای گوندی ای و نئوسپورا کانینوم در مقایسه با سولفادیازین در محیط کشت سلولی ارزیابی شد که نشان داد به طور کلی *T. japonica* و *S. flavescence* مهار کننده بهتری برای هر دو انگل هستند. میزان کاهش تکثیر انگل های مجاورت داده شده با غلظت های 5/312، 3/156 و 1/78 نانوگرم به ازای هر حفره عصاره *T. japonica* در مقایسه با کنترل ها به ترتیب 99/7، 98 و 80/8٪ بود. این درصدهای مهاری برای عصاره *S. flavescence* به

ترتیب 98/5، 71/7 و 70/8 بود (50). در مطالعه Jones-Brando و همکاران (2006) اثر مهاری چهار مشتق جدید آرتیمی سینین (Artemisinin) بر توکسوپلازما در *in vitro* بررسی شد. در این مطالعه میانگین دوز مهاری (inhibitory dose= ID50) و میانگین دوز توکسیک (Toxic dose= TD50) برای هر یک از ترکیبات بدست آمد. سه تا از ترکیبات آرتیمی سینین در غلظت کمتر از 1 µg/ml و چهارمی در غلظت بین 2 و 3 میکروگرم در میلی لیتر توکسوپلازما را مهار کرد. مقدار آن برای تری متوپریم 5/2 µg/ml بود. ترکیبات آرتیمی سینین توکسیسیتی کمتری از تری متوپریم داشتند، به طوری که مشتقات آرتیمی سینین تنها در غلظت های بالاتر از 160 µg/ml سیتوتوکسیسیتی نشان دادند و حال آنکه TD50 تری متوپریم معادل 60 µg/ml بود (51). در مطالعه Al-Zanbagi و همکاران (2007) فعالیت ضد توکسوپلاسمایی عصاره Myrrh در مقایسه با اسپیرامایسین در *in vivo* ارزیابی شد. موش ها پس از تلقیح داخل صفاقی 200 تاکی زوئیت از همان روز تحت تجویز روزانه 100 و 200 mg/kg عصاره قرار گرفتند. در پایان چهارمین روز پس از تلقیح، تاکی زوئیت ها از حفره صفاقی موش های تحت تجویز عصاره، موش های تحت تجویز اسپیرامایسین و موش های کنترل پونکسیون و شمارش شد. عصاره Myrrh اثر مهاری قویتری از اسپیرامایسین داشت (52). در مطالعه Choi و همکاران (2013) اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره (GE) و فراکشن (GE/F1) گیاه *Zingiber officinale* (زنجبیل) در غلظت های 30-240 میکروگرم در میلی لیتر در محیط کشت سلولی C6 ارزیابی شد. ویابلیتی سلول های C6 با افزایش دوز و زمان انکوباسیون کاهش نشان داد. به ویژه GE در مقایسه با سایر عصاره ها به شدت تکثیر و ویابلیتی سلول های آلوده به تاکی زوئیت ها را کاهش داد. مجاورت با GE/F1 سبب فرگمنته شدن تاکی زوئیت ها، کاهش معنی دار در تعداد آنها و همچنین سبب تغییرات مورفولوژیک در سلول های C6 شد. GE/F1 به طور موثری ویابلیتی سلول های C6 آلوده به تاکی زوئیت ها و تاکی زوئیت ها را در مقایسه با سولفادیازین مهار کرد. IC50 توکسوپلازما برای GE ،

GE/F1 و سولفادیازین (SF) به ترتیب 220/83 ، 205/56 و 276/81 میکروگرم در میلی لیتر بود. همچنین، GE/F1 به طور انتخابی تکثیر تاکی زوئیت ها و تشکیل غشاء واکوئل پارازیتوفروس (PVM) را در سلول های آلوده مهار کرد. از طرف دیگر در این مطالعه نشان داده شد که GE/F1 قادر است به طور موثری آپوپتوز سلول های C6 القا شده به وسیله تهاجم تاکی زوئیت ها را از طریق مهار مستقیم تاکی زوئیت ها مهار کند. تفاوت معنی داری بین بقای موش های تلقیح شده با تاکی زوئیت ها و موش های تلقیح شده با تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با GE/F1 مشاهده نشد (53).

در مطالعه Jiang و همکاران (2008) اثر ضد توکسوپلاسمایی اولئوروپین (oleuropein) بدست آمده از گیاه *Fraxinus rhychophylla* در *in vivo* و *in vitro* ارزیابی شد و selectivity اولئوروپین (8/9) از سولفادیازین (3/8) و پریمتامین (2/5) بیشتر بود. میزان مهار تاکی زوئیت ها در موش های تحت درمان با اولئوروپین به میزان 300 mg/kg در مقایسه با موش های کنترل 54٪ بود (54). در مطالعه De Oliveira و همکاران (2009) اثر دم کرده *Artemisia annua* L. (infusion) روی حساسیت به عفونت توکسوپلازما در مدل تجربی *in vitro* و *in vivo* ارزیابی شد. در این مطالعه از سلول های HFF برای کشت سلولی استفاده شد. تاکی زوئیت ها به مدت یک ساعت در 37 درجه و 5% CO₂ با رقت های سریال دو برابر دم کرده *A. annua* (2500-80 µg/ml) یا سولفادیازین (1.56-200 µg/ml) و یا محیط کشت تنها (کنترل) با سلول های مونولایر روی لامل ها انکوبه شدند. در تجربه دیگری، مجاورت پس از 3 ساعت از آلودگی سلول ها با تاکی زوئیت ها تکرار شد. نتایج به صورت درصد مهار عفونت و تثیر داخل سلولی انگل برای هر مجاورت نسبت به کنترل بیان شد. میانگین غلظت مهاری (IC₅₀) محاسبه شد. بر اساس نتایج این مطالعه، ویابلیتی سلول های HFF در غلظت های مختلف دم کرده *A. annua* و سولفادیازین بالای 72٪ بود. مجاورت تاکی زوئیت ها با *A. annua* قبل از عفونت در سلول های HFF منحنی مهاری dose-response نشان داد که به 75٪ مهار رسید که مشابه نتایج

بدست آمده با سولفادیازین بود. در تجارب *in vivo* دم کرده *A. annua* کنترل موثری بر سویه کیست ساز توکسوپلاسم (ME-49) نشان داد. منحنی بقاء موش های آلوده شده با سویه RH بین موش های تحت تجربه با دم کرده *A. annua* و موش های تحت تجربه با سولفادیازین اختلاف معنی دار نداشت (55). در مطالعه AL-zanbazi و همکاران (2009) اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره گیاهان فلفل سیاه، فلفل قرمز، دارچین و زردچوبه در *in vivo* بررسی شد. در این مطالعه موش ها با 200 تاکی زوئیت سویه RH به طریق داخل صفاقی آلوده شدند و از 24 ساعت بعد از تلقیح، روزانه تا 7 روز پس از عفونت تحت تجویز عصاره های آبی و الکلی گیاهان فوق با دوزهای 100 و 200 میلی گرم به ازای کیلوگرم قرار گرفتند. اسپیرامایسین نیز با همین دوز به عنوان داروی رفرنس استفاده شد. با دوز روزانه 100 میلی گرم کمترین و بیشترین اثر مهاری عصاره آبی به ترتیب مربوط به فلفل سیاه (81/2٪) و زردچوبه (97/4٪) بود (درمقایسه با 71٪ برای اسپیرامایسین) (56). در مطالعه Kavitha و همکاران (2012) اثر ضد توکسوپلاسمایی چهار فراکشن عصاره ریشه گیاه *Eurycoma longifolia jack* در کشت سلولی Vero cells مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه از سویه RH توکسوپلاسم و غلظت های نهایی 1/56-100 میکروگرم در میلی لیتر فراکشن ها و کلیندامایسین استفاده شد و میانگین غلظت موثره (Effective Concentration=EC50) تعیین گردید. بر اساس نتایج این مطالعه، همه نمونه ها اثر کشندگی بر توکسوپلاسم داشتند و بیشترین اثر کشندگی مربوط به فراکشن TAF 355 بود. EC50 برای کلیندامایسین، 0/016 و برای TAF 355 ، 0/369 بود. همچنین، اثر مهار کنندگی فراکشن های TAF 355 و TAF 401 با افزایش غلظت، افزایش نشان داد (57). در گزارش بعدی Youn و همکاران (2004) اثر ضد تک یاخته ای فراکشن HPLC عصاره های *Torilis japonica* و *Sophora flavescence* روی نئوسپورا کانینوم و توکسوپلاسم گوندی ای بررسی شد. دو فراکشن از *T. japonica* و پنج فراکشن از *S. flavescence* بدست آمد. غلظت های 2/850، 1/425، 0/713 و

0/356 نانوگرم به ازای هر میلی لیتر فراکشن ها با تاکی زوئیت های نئوسپورا و توکسوپلاسمای مجاورت داده شد. از ^3H -uracil incorporation برای تعیین توانایی فراکشن ها در مهار تکثیر انگل استفاده شد. به طور کلی در بالاترین غلظت (2/850)، فراکشن S. flavescent، SF1 و فراکشن T. TJ2، japonica دارای بیشترین اثر مهاری به ترتیب 99/6 و 99/2 درصد بودند. در این غلظت اثر مهاری سولفادیازین 97٪ بود (58). در مطالعه Chen و همکاران (2008) فعالیت ضد توکسوپلاسمایی عصاره اتری Ginkgo biloba sarcotestas به نام GAS (ginkgolic acid) در *in vitro* در محیط کشت سلولی (HFF) human foreskin fibroblast ارزیابی شد. اثر GAS در مقایسه با آزیترومايسين در غلظت های 3/13 تا 100 میکروگرم در میلی لیتر بررسی شد. در این مطالعه غلظت ایمن آزیترومايسين (میزان تکثیر 90٪) برای 24 و 48 ساعت انکوباسیون به ترتیب 167/1 و 115/2 میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. توکسیسیته GAS برای سلول های HFF کمتر از آزیترومايسين بود. به طوری که غلظت GAS برای میزان تکثیر 90٪ بعد از 24 و 48 ساعت انکوباسیون به ترتیب غلظت های 172 و 154/6 میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. در این مطالعه از ^3H -Leu و ^3H -TdR برای ارزیابی DNA توکسوپلاسمای و سنتز پروتئین استفاده شد. GAS قادر بود در تمامی غلظت ها هم سنتز DNA و هم سنتز پروتئین توکسوپلاسمای را در روش وابسته به زمان مهار کند (59).

در مطالعه Choi و همکاران (2008)، فعالیت ضد توکسوپلاسمایی عصاره های متانولی 15 گیاه دارویی بر تاکی زوئیت های سویه RH توکسوپلاسمای در محیط کشت سلولی Hella در مقایسه با پریمتامین بررسی شد. در این مطالعه عصاره های Acorus gramineus Soland، Glycyrrhiza glabra L. و Dryopteris crassirhizoma بیشترین فعالیت ضد توکسوپلاسمایی داشتند (EC50=0.11-0.15 mg/ml) اما توکسیسیته انتخابی نداشتند (Selectivity=1.7-2.5). Sophora flavescens Aiton. فعالیت ضد توکسوپلاسمایی (EC50= 0.20mg/ml) و توکسیسیته انتخابی بالایی

(Selectivity=4.6) نشان داد. همچنین، *Zingiber officinale* (زنجبیل) فعالیت ضد توکسوپلاسمایی بالایی داشت ($EC_{50}=0.18\text{mg/ml}$) و سیتوتوکسیسیته آن در مقابل سلول های HeLa ($EC_{50}=1.81\text{ mg/ml}$) بود. زنجبیل فعالیت قوی ضد توکسوپلاسمایی (Selectivity=10.1) نسبت به پریمتامین (Selectivity=2.1) و اسپیرامایسین (Selectivity=2.5) نشان داد (60). در تنها مطالعه اثر ضد توکسوپلاسمایی گیاهان بومی ایران، خوش زبان و همکاران (1387) نشان دادند که عصاره آبی سیر بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما اثر دارد. به طوری که مدت زمان بقای موشهای تحت درمان با این عصاره در مقایسه با موش های شاهد افزایش معنی دار داشت (93).

فصل سوم

مواد و روش ها

1-3: تهیه گیاهان مورد مطالعه و شناسایی آنها: در این مطالعه، اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره گیاهان

کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاددرخت و اسپند بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما در محیط برون تنی (*in vitro*) عاری از سلول و در کشت سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهان مورد مطالعه توسط متخصص گیاه شناسی جمع آوری و شناسایی شدند و یک نمونه از هر گیاه در پژوهشگاه گیاهان دارویی ثبت و نگهداری شد.

2-3: عصاره: عصاره گیری تحت نظارت متخصص فارماکوتکنولوژی انجام شد. به طور خلاصه، پس از

خشک کردن و آسیاب کردن گیاهان، نیم کیلوگرم از آنها ابتدا توسط اتانول و به وسیله دستگاه پرکولاتور عصاره گیری شد. این عمل برای سه بار تکرار گردید و سپس عصاره های حاصل بوسیله دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ شدند. میزان عصاره خشک محاسبه و با انجام آزمایش های مقدماتی، به کمک حلال دی متیل سولفاکساید (Dimethyl sulfoxide=DMSO) غلظت های متفاوت از هر عصاره گیاهی تهیه شد.

3-3: تهیه و نگهداری سویه توکسوپلازما گوندی ای: در مطالعه حاضر از سویه RH توکسوپلازما

گوندی ای استفاده شد. این سویه به طور دوستانه از گروه انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه گردید و در آزمایشگاه بخش انگل شناسی از طریق پاساژ های داخل صفاقی در موش های سوری تکثیر و نگه داری شد.

4-3: ارزیابی اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی: اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها در

شرایط برون تنی عاری از سلول و در کشت سلولی انجام شد:

1-4-3: اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در شرایط برون تنی عاری از سلول

در مطالعه حاضر تاکی زوئیت های سویه RH توکسوپلازما گوندی ای در داخل میکروتیوپ با غلظت های مختلف عصاره اتانولی 5 گیاه کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاد درخت و اسپند مجاورت داده شدند و اثر کشندگی آنها بر انگل ارزیابی شد.

2-4-3: تهیه و آماده سازی عصاره های گیاهی:

مواد و وسایل مورد نیاز: عصاره اتانولی گیاه، ظروف شیشه ای، اپلیکاتور (قاشقک) فلزی، شعله، DMSO، ترازوی دیجیتال، آب مقطر.

3-4-3: تهیه غلظت های مختلف از عصاره ها:

از هر یک از عصاره ها غلظت های 200، 100، 50 و 10 میلی گرم/میلی لیتر به روش زیر تهیه شد. یک گرم از هر عصاره را با ترازو وزن کرده و در ظرف شیشه ای ریخته سپس توسط قاشقک فلزی در کنار شعله با اضافه کردن تدریجی یک میلی لیتر 1% DMSO در PBS کاملاً حل گردید (1000mg/ml). این غلظت از عصاره به عنوان ذخیره (Stock) در دمای 4 درجه نگهداری شد. از این غلظت ذخیره، با استفاده از PBS غلظت های فوق تهیه شد.

4-4-3: تکثیر و آماده سازی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای:

مواد و وسایل مورد نیاز: سرنگ انسولین، سرنگ معمولی در اندازه های 2 و 5 میلی لیتری، گازاستریل، ماسک، دستکش لاتکس، دستکش یکبار مصرف، لام، لامل، لام نئوبار، پیت پاستور، پیت های شیشه ای، لوله های فالكون 15 و 50 میلی لیتری.

روش اجرا: در هر بار برای تکثیر و جمع آوری تاکی زوئیت ها، حدود 10^6 تاکی زوئیت تازه به طریق داخل صفاقی به 3-4 موش تلقیح شد. حدود 72 ساعت بعد از تلقیح، تاکی زوئیت های تکثیر یافته در صفاق موش ها از طریق شستشوی حفره صفاقی با سرم فیزیولوژی جمع آوری شدند. تاکی زوئیت های

جمع آوری شده به داخل لوله سانتریفیوژ استریل منتقل و سه بار با استفاده از محلول Phosphate buffer saline (PBS) PH 7.4, 0.15 M شستشو شدند. در مرحله بعد به منظور بالا بردن درصد خلوص تاکی زوئیت های جمع آوری شده و خارج کردن سلول های صفاقی، سوسپانسیونی از رسوب تهیه و به مدت 5 دقیقه با دور 200g سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی به لوله دیگری منتقل و با دور 1000g به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل از سانتریفیوژ PBS اضافه شد و مجدداً سوسپانسیون یکنواختی تهیه شد. تعداد تاکی زوئیت ها در سوسپانسیون با استفاده از لام نئوبار شمارش شد و با استفاده از PBS سوسپانسیون حاوی 10^7 تاکی زوئیت در میلی لیتر تهیه شد. از این سوسپانسیون برای ارزیابی اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها در شرایط برون تنی عاری از دودمان سلولی استفاده شد.

5-4-3: تهیه و آماده سازی رنگ متیلن بلو قلیایی: این رنگ بر اساس پروتکل ارائه شده توسط جانسون و هالیمن (21) تهیه شد:

مواد مورد نیاز: پودر تترابورات سدیم، پودر کربنات سدیم، پودر متیلن بلو، الکل اتیلیک مطلق، آب دیونیزه، بالن، ترازو دیجیتال، PH متر، کاغذ صافی.

روش تهیه رنگ متیلن بلو: مقدار 0/028 گرم از پودر تترابورات سدیم به همراه حدود 0/25 گرم پودر کربنات سدیم در بالن ریخته و با اضافه کردن تدریجی 50 میلی لیتر آب دیونیزه پودرها کاملاً حل شد. در مرحله بعد مقدار 0/032 گرم از پودر متیلن بلو در 2 میلی لیتر الکل اتیلیک مطلق حل و پس از عبور از کاغذ صافی، با محلول فوق به خوبی مخلوط شد. سپس PH محلول فوق در ظرف با PH متر سنجیده شد و روی 11 = PH تنظیم شد. محلول آماده شده در ظرف تیره پوشانده شده با فویل ریخته و در یخچال 4 درجه سانتی گراد نگهداری شد.

6-4-3: مجاورت عصاره های گیاهی با تاکی زوئیت ها و تعیین درصد مرگ سلولی:

مواد و وسایل مورد نیاز: سمپلر و سر سمپلر در اندازه های مختلف، میکروتیوپ، ساعت، لام، لامل، رنگ متیلن بلو، میکروسکوپ.

روش اجرا: در این مرحله 50 میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی 5×10^5 تاکی زوئیت با 50 میکرو لیتر از غلظت های مختلف عصاره ها در داخل میکروتیوپ در دمای آزمایشگاه مجاورت داده شد. هر یک از غلظت ها به طور جداگانه در مدت زمان های 10، 30 و 45 دقیقه با تاکی زوئیت ها مجاورت داده شدند. در پایان هر زمان انکوباسیون، 5 میکرولیتر از سوسپانسیون تاکی زوئیت ها پس از مخلوط کردن به سطح لام منتقل و با افزودن 5 میکرولیتر رنگ آبی متیلن مخلوط گردید و با لامل پوشانده شد. بعد از 2-3 دقیقه میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها تعیین شد. بدین ترتیب که حدود 250-300 تاکی زوئیت با درشتنمایی $400 \times$ شمارش و نسبت تعداد تاکی زوئیت های کشته شده (رنگ نگرفته) به تعداد کل تاکی زوئیت ها برای هر یک از عصاره ها در غلظت ها و زمان های مختلف انکوباسیون برآورد شد. از سوسپانسیون تاکی زوئیت ها در PBS و سوسپانسیون تاکی زوئیت ها در DMSO به عنوان کنترل استفاده شد. تمامی تجارب به صورت سه گانه انجام و سه بار تکرار شد و میانگین و انحراف معیار برای هر مورد تعیین گردید.

7-4-3: زیست سنجی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با عصاره ها در موش:

از روش زیست سنجی در موش برای تایید 100٪ اثر کشندگی عصاره ها بر تاکی زوئیت ها استفاده شد. در این مطالعه، حداقل غلظتی از هر عصاره که در کمترین مدت زمان انکوباسیون، 100٪ اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها داشت، به این روش مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور به سه موش و هر کدام 50 میکرولیتر از نمونه مجاورت داده شده با عصاره به طریق داخل صفاقی تزریق شدند. موش ها تا یک

ماه روزانه تحت نظر قرار گرفتند تا اگر کز کردند و تحرکشان به طور قابل توجهی کاسته شد، از نظر تاکی زوئیت ها در مایع صفاقی بررسی شوند. همزمان به موش کنترل، تاکی زوئیت های بدون مجاورت با عصاره تلقیح شد.

5-3: اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در کشت سلولی:

1-5-3: دودمان سلولی مورد استفاده، تهیه، تکثیر و نگهداری آن:

تهیه دودمان سلولی: در این مطالعه برای ارزیابی اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها بر تاکی زوئیت ها در کشت سلولی از سلول های Hela استفاده شد. این سلول ها از انستیتو پاستور ایران خریداری و با استفاده از فلاسک 25 میلی لیتری حاوی مواد مغذی به دانشگاه علوم پزشکی قزوین منتقل شدند.

تکثیر و نگهداری دودمان سلولی:

مواد و وسایل مورد نیاز: سرنگ انسولین، سرنگ های 2، 5 و 10 میلی لیتری، گازاستریل، ماسک، دستکش لاتکس و دستکش یکبار مصرف، لام، لامل، لام ثوبار، پیپت پاستور، پیپت های شیشه ای، لوله فالكون 15 و 50 میلی لیتری، ظروف شیشه ای آزمایشگاهی مانند بالن ژوژه، پتری دیش، استوانه مدرج، ارلن، بشر، سمپلر و سر سمپلر در اندازه های مختلف، میکروپلیت 96 خانه ای ته صاف.

2-5-3: محلول های مورد نیاز:

بافر فسفات سالین (PBS): از این بافر برای شستشوی سلولها و تهیه برخی از محلولها استفاده گردید. برای تهیه این بافر مقادیر زیر با ترازوی دیجیتال وزن کرده و به تدریج با افزودن آب مقطر دیونیزه تا حجم ۹۵۰ میلی لیتر حل کرده و پس از تنظیم نمودن pH (۷/۷-۲/۴) با سود یا اسید کلریدریک 1 نرمال، محلول به حجم یک لیتر رسانده شد.

Nacl	KCL	Na2HPO4, 2H2o	KH2PO4
------	-----	---------------	--------

8 g	0.2 g	1.15 g	0.2 g
-----	-------	--------	-------

ال - گلوتامین (2 میلی مولار): 0/6 گرم از پودر ال- گلوتامین داخل ارلن با 20 سی سی PBS کاملاً حل گردید و مایع شفاف حاصل شد. سپس در زیر هود توسط فیلتر سر سرنگی استریل و در میکروتیوپ های استریل در حجم های 1 میلی لیتر تقسیم و در 20- نگهداری شد (برای هر 100 میلی لیتر محیط کشت، 0/5 میلی لیتر ال- گلوتامین استفاده شد).

پن استرپ: به صورت تجاری و آماده با دوز 10000 واحد از شرکت Gipro آلمان خریداری شد. به ازاء هر 10 میلی لیتر از محیط کشت، مقدار 50 میکرولیتر پن استرپ استفاده شد.

محلول رنگ آمیزی تریپان بلو: این رنگ جهت تعیین درصد حیات سلول های جدا شده مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه رنگ به ترتیب زیر عمل شد:

تریپان بلو	0/04 گرم
بافر فسفات سالین	10 میلی لیتر

در این روش سوسپانسیون سلولی به نسبت 1:1 با محلول رنگ مخلوط و در عرض 5-10 دقیقه زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 40 درصد سلول های رنگ نگرفته (زنده) شمارش شدند. جهت تهیه این محلول مقادیر فوق تهیه و سپس فیلتر شد.

تهیه محیط مغذی برای کشت سلول: در یک فالكون استریل در زیر هود 45 میلی لیتر RPMI 1640 ریخته و سپس 5 میلی لیتر Fetal Bovin Serum (FBS) به آن اضافه شد. سپس 1 میلی لیتر ال- گلوتامین و 250 میکرولیتر پن استرپ به آن اضافه گردید. درب فالكون را بسته و با پارافیل کاملاً پوشانده

شد تا مانع تبخیر شود. از این محیط برای پاساژ سلول ها و تعویض محیط کشت سلولی استفاده شد. این محیط در 4 درجه نگهداری شد.

شمارش سلول های هلا و تعیین ویابلیتی سلول ها: پس از تریپسینه کردن فلاسک کشت، سوسپانسیون سلولی 2 بار و هر بار به مدت 10 دقیقه در دور 1500g سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب ته فالكون با پیپت پاستور به آرامی پیپتاژ شد تا یک سوسپانسیون یک دست از سلول های هلا بدست آید و سلول ها آسیب نبینند. در مرحله بعد، 10 μ l از سوسپانسیون سلولی همراه با 10 μ l از محلول رنگ آمیزی تریپان بلو 0/4% داخل میکروتیوپ استریل اضافه کرده و به آرامی با هم مخلوط شدند. برای تعیین درصد ویابلیتی، تعداد سلول های مرده (رنگ گرفته) و سلول زنده (رنگ گرفته) با استفاده از لام نئوبار در خانه های WBC شمارش و با استفاده از فرمول زیر درصد ویابلیتی (viability) سلول ها تعیین شد. پس از شمارش سلولی با استفاده از RPMI1640، رقتی از سلول ها تهیه شد که در هر 100 میکرولیتر آن حاوی 60000 سلول بود.

فرمول شمارش سلول های Hela

حجم سوسپانسیون $\times 10^4 \times 2 \times$ (ضریب رقت) \times تعداد سلولها در مربع های 16 تایی = تعداد کل سلول ها

فرمول محاسبه Viability

$Viability = [سلول های زنده و مرده (کل سلول ها) / تعداد سلول های زنده] \times 100$

3-5-3: آماده سازی تاکی زوئیت ها:

تاکی زوئیت های تکثیر یافته در موش ها (مطابق روش 3-4-4) بعد از 72 ساعت جمع آوری شدند. سپس پونکسیون صفاقی با PBS استریل با $PH = 7/2$ ، 0/15 مولار تاکی زوئیت ها را جمع آوری نموده در لوله ریخته و 10 دقیقه در دور 200 g سانتریفیوژ گردید. سپس قسمت رویی را برداشته و در

لوله دیگر ریخته و در دور 1000 g به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد. در مرحله بعد، مایع رویی را دور ریخته و به رسوب، RPMI 1640 بدون FBS اضافه شد و زنده بودن انگل ها با تست تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس توسط لام نئوبار تعداد انگل ها را محاسبه کرده و با دادن رقت با PBS تعداد مورد نیاز برای انجام آزمایش (3×10^7) بدست آمد. برای محاسبه و شمارش سلولی از لام نئوبار محل شمارش WBC استفاده شد.

4-5-3: آماده سازی عصاره ها برای مجاورت با تاکی زوئیت ها در کشت سلولی:

تهیه غلظت ذخیره (stock): مقدار 0/02 gr (20mg میلی گرم) هر عصاره با اضافه کردن تدریجی یک میلی لیتر RPMI و 1% DMSO کاملاً حل گردید و تا زمان استفاده در دمای 4 درجه سانتی گراد عنوان stock نگهداری شد.

تهیه غلظت های کار عصاره: از محلول ذخیره، با استفاده از RPMI 1640 غلظت های 50، 100 و 200 میکروگرم در میلی لیتر به عنوان غلظت های کار (غلظت هایی از هر عصاره که با تاکی زوئیت ها مجاورت داده شد) تهیه شد. بدین ترتیب که ابتدا محلول ذخیره به نسبت 1 به 20 با RPMI مخلوط شد (40 میکرولیتر محلول ذخیره به 1960 میکرولیتر RPMI اضافه شد). از این غلظت با استفاده از RPMI رقت های سریال دو برابر تهیه شد که غلظت 200، 100 و 50 بدست آمد.

5-5-3: تهیه و آماده سازی داروی پریمتامین:

الف- پودر پریمتامین با خلوص 98 درصد به وزن 250 میلی گرم از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شد. این دارو به نسبت 1:1 با حلال (اتانول-استن) حل و غلظت 10 میکروگرم در میلی لیتر از دارو بدست آمد (37). از این غلظت به عنوان محلول ذخیره، 1، 0/1 و 0/01 به عنوان غلظت های کار تهیه شد.

ب- تهیه غلظت های کار پریمتامین :

برای تهیه غلظت های کار به ترتیب زیر عمل شد: از محلول ذخیره میزان 1 میلی لیتر برداشته و با 9 میلی لیتر محیط کشت RPMI 1640 مخلوط گردید ($1\mu\text{g/ml}$). از این محلول، مقدار 1 میلی لیتر برداشته و با 9 میلی لیتر محیط کشت RPMI 1640 مخلوط گردید ($0/1\mu\text{g/ml}$). غلظت ده برابر بعدی ($0/01\mu\text{g/ml}$) نیز به همین ترتیب تهیه شد.

3-5-6. مجاورت عصاره های گیاهی و داروی پریمتامین با تاکی زوئیت ها:

$100\mu\text{l}$ از سوسپانسیون کشت سلولی حاوی 6×10^4 سلول هلا به هر چاهک میکروپلیت های 96 خانه ای اضافه شد. میکرو پلیت ها به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37°C تحت شرایط $5\% \text{CO}_2$ قرار گرفته شد. بعد از سپری شدن 24 ساعت، سلول های هلا از نظر چسبندگی و زنده بودن با میکروسکوپ اینورت بررسی شدند. سپس 50 میکرولیتر از سوسپانسیون تاکی زوئیت های تهیه شده به روش 3-4-4 حاوی 3×10^5 تاکی زوئیت به هر چاهک اضافه شد (نسبت تاکی زوئیت به سلول 5 به 1 بود) (57,60). پس از افزودن تاکی زوئیت ها، بلافاصله میکروپلیت در انکوباتور 37°C درجه سانتی گراد و تحت شرایط $5\% \text{CO}_2$ به مدت 6 ساعت قرار گرفت. بعد از این مدت محیط رویی میکروپلیت توسط مولتی سمپلر تخلیه و با افزودن 100 میکرولیتر محیط مغذی RPMI1640 جایگزین شد (این مرحله به منظور حذف تاکی زوئیت های خارج سلولی انجام شد). سپس میکروپلیت به مدت 24 ساعت در انکوباتور تحت شرایط فوق نگهداری شد. بعد از این مدت بر اساس چارت زیر غلظت های مختلف عصاره ها و دارو (به عنوان کنترل) به چاهک ها اضافه شد و دوباره انکوباسیون با شرایط فوق به مدت 24 ساعت تکرار شد. بعد از خاتمه انکوباسیون، 10 میکرولیتر از محلول کیت MTT (ایده زیست نو ترکیب) به هر چاهک افزوده شد و سپس به مدت 4 ساعت در شرایط مشابه انکوبه شد (تا بلورهای فورمازان نمایان شوند).

چارت مجاورت تاکی زوئیت ها با غلظت های مختلف عصاره ها و دارو در کشت سلولی در

داخل میکروپلیت

C1	C3	C5	C7	HTE1	HTE3	HE1	HE3				
C1	C3	C5	C7	HTE1	HTE3	HE1	HE3				
C1	C3	C5	C7	HTE1	HTE3	HE1	HE3				
C2	C4	C6		HTE2	HTE4	HE2	HE4				
C2	C4	C6		HTE2	HTE4	HE2	HE4				
C2	C4	C6		HTE2	HTE4	HE2	HE4				

C1=Hela+RPMI 1640; C2=DMSO+Hela+RPMI 1640; C3=Hela+Tachyzoite+drug 10µg/ml; C4=Tachyzoite+drug 1µg/ml; C5=Tachyzoite+drug 0.1µg/ml; C6=Tachyzoite+drug 0.01µg/ml; C7=DMSO+Hela+tachyzoite; HE 1= Hela+extract 400 µg/ml; HE 2= Hela+extract 200 µg/ml; HE 3= Hela+extract 100 µg/ml; HE 4= Hela+extract 50 µg/ml; HTE 1= Hela+tachyzoite+extract 400 µg/ml; HTE 2= Hela+tachyzoite+extract 200 µg/ml; HTE 3= Hela+tachyzoite+extract 100 µg/ml; HTE 4= Hela+tachyzoite+extract 50 µg/ml

7-5-3: سنجش اثر سایتوتوکسیسیته با روش MTT

تهیه محلول MTT:

مواد مورد نیاز: پودر MTT ، بافر PBS ، DMSO

روش اجرا: 25 میلی گرم پودر زرد رنگ MTT در 5 میلی لیتر RPMI 1640 حل شد (mg/ml 5). پس از حل شدن کامل پودر، محلول در زیر هود با استفاده از فیلتر سرسرنگی $0.22\mu\text{m}$ فیلتر شد تا هم استریل شود و هم ذرات نامحلول احتمالی موجود در آن حذف شود. این محلول استریل در حجم های یک میلی لیتری تقسیم و در ظرف های مخصوص کیت در تاریکی و دمای -20°C درجه نگهداری شد. در موقع نیاز، محلول از فریز خارج و در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا ذوب شود. لازم به ذکر است که تمام مراحل ساخت محلول مذکور و استریلیزاسیون آن در شرایط تاریکی و داخل هود انجام شد.

روش انجام آزمایش MTT: پس از خاتمه انکوباسیون نمونه ها با محلول MTT، به هر چاهک 50 میکرولیتر از DMSO کیت افزوده و کاملاً با پیپت مخلوط شد. سپس به مدت 10 دقیقه در انکوباتور 37°C درجه سانتی گراد با 5 درصد CO_2 قرار داده شد. در نهایت دانسیته نوری (Optical Density=OD) نمونه ها با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر الایزا (Epoch, USA) در طول موج 570nm و طول موج رفرنس 630nm قرائت شد.

با استفاده از OD های بدست آمده، *Viability*، *EC50* و *Selectivity* محاسبه شد.

$$\text{Viability} = 100 \times [\text{کل سلول ها} / \text{تعداد سلول های زنده}]$$

$$\text{EC50} = \text{median effective concentration}$$

$$\text{Selectivity} = \text{EC50 Hela cell} / \text{EC50 Toxoplasma RH strain}$$

EC50 با توجه به OD های بدست آمده و با استفاده از نرم افزار Prism محاسبه شد.

تمامی تجارب به صورت سه گانه انجام و سه بار تکرار شد و میانگین و انحراف معیار برای هر مورد تعیین گردید.

ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی محدود به کار با موش های آزمایشگاهی بود. تلاش شد، موش ها در شرایط مناسب حیوانخانه ای نگهداری شوند و برای کشتن آنها از تزریق کتامین و زایلازین استفاده شد.

آنالیز آماری

علاوه بر آمار توصیفی از آزمون های ANOVA، توکی، کروسکال والیس و کولموگروف-اسمیرنف استفاده شد. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS-16 آنالیز شد و سطح معنی داری کمتر از 0/05 در نظر گرفته شد.

فصل چهارم

نتایج

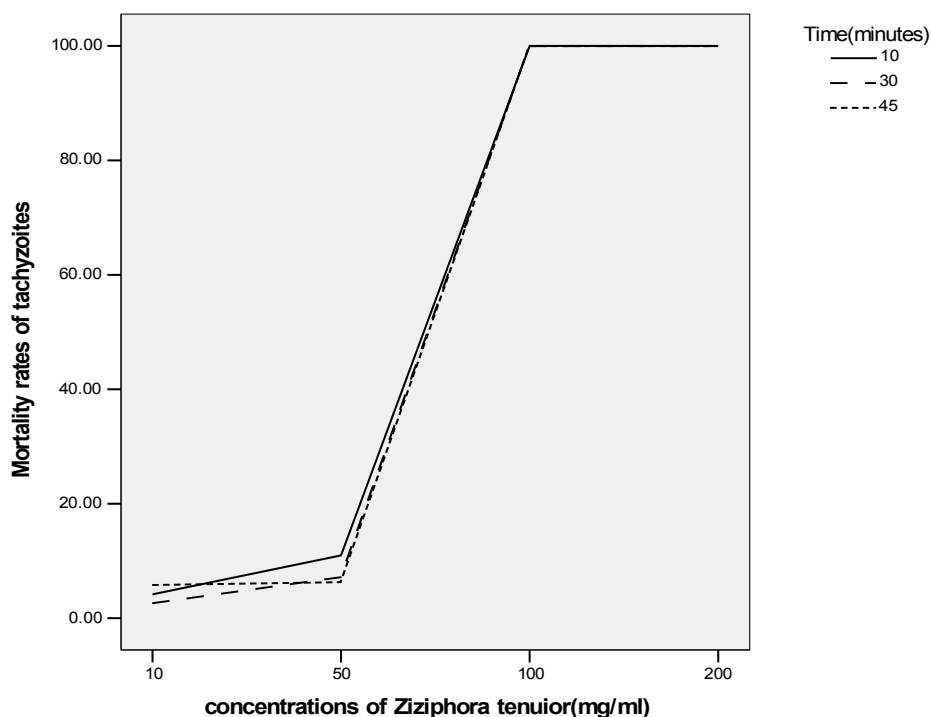
اثرات ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی در شرایط برون تنی عاری از سلول

میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره کاکوتی: عصاره کاکوتی در غلظت های مختلف دارای اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها بود. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت های مختلف کاکوتی در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول 1 و شکل 1 نشان داده شده است.

جدول 1. میانگین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلاسمای گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه کاکوتی در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت عصاره کاکوتی (میلی گرم/میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون
10	50	100	200	(دقیقه)
2/63 ± 1/49	6/32 ± 4/7	100	100	10
4/15 ± 1/49	7/18 ± 8/74	100	100	30
5/82 ± 2/01	10/97 ± 7/6	100	100	45

میزان کشندگی در غلظت های 50 و 10 با افزایش زمان انکوباسیون افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0.05$) ولی بین غلظت های 10 و 50 در زمان های ثابت انکوباسیون تفاوت معنی داری وجود نداشت.



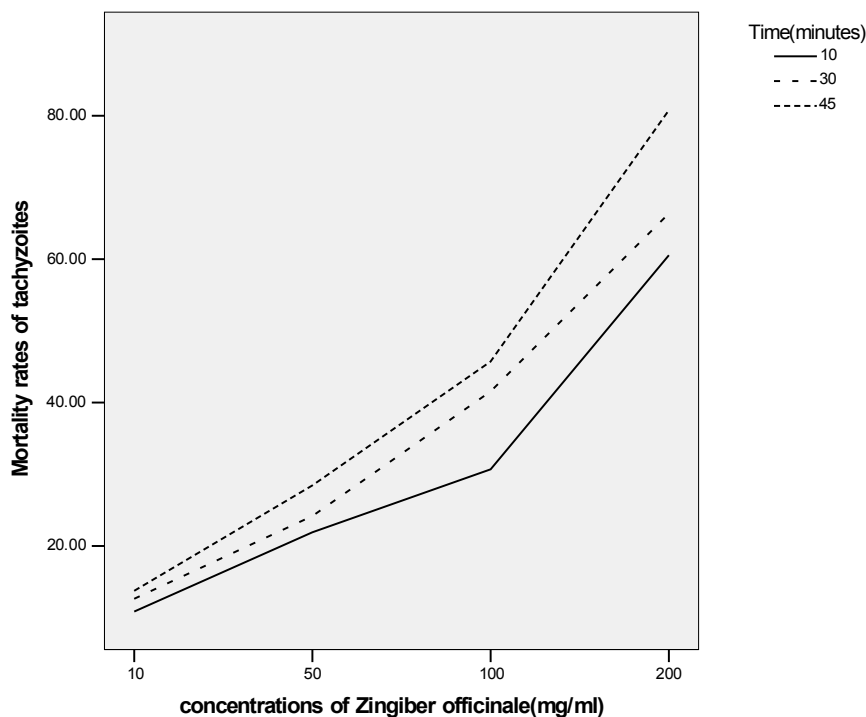
شکل 1. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های 10، 50، 100 و 200 میلی گرم در میلی لیتر عصاره کاکوتی در مدت زمان 10، 30 و 45 دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.

مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره زنجبیل: عصاره زنجبیل در غلظت های مختلف دارای اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها بود. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت های مختلف زنجبیل در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول 2 و شکل 2 نشان داده شده است.

جدول 2. میانگین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتا نولی گیاه زنجبیل در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت عصاره زنجبیل (میلی گرم/میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)
10	50	100	200	
10/86 ± 3/42	21/91 ± 1/44	30/69 ± 1/75	80/75 ± 9/53	10
12/63 ± 1/31	24/17 ± 2/06	41/54 ± 0/71	66/36 ± 5/65	30
13/74 ± 0/99	28/44 ± 1/83	45/72 ± 1/44	60/55 ± 2/99	45

میزان کشندگی عصاره زنجبیل با افزایش غلظت، افزایش معنی دار نشان داد ($P < 0.001$). میزان کشندگی هر یک از غلظت های 10، 50 و 100 میلی گرم در میلی لیتر به طور جداگانه در مدت زمان های مختلف انکوباسیون تفاوت معنی دار نشان نداد ولی در هر یک از مدت زمان های انکوباسیون، درصد مورتالیتی با افزایش غلظت افزایش معنی دار نشان داد ($P < 0.001$).



شکل 2. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های 10، 50، 100 و 200 میلی گرم در میلی لیتر عصاره زنجبیل در مدت زمان 10، 30 و 45 دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.

میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره برگ گردو: عصاره برگ گردو در تمامی غلظت ها دارای اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها بود. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت های مختلف برگ گردو در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول 3 و شکل 3 نشان داده شده است.

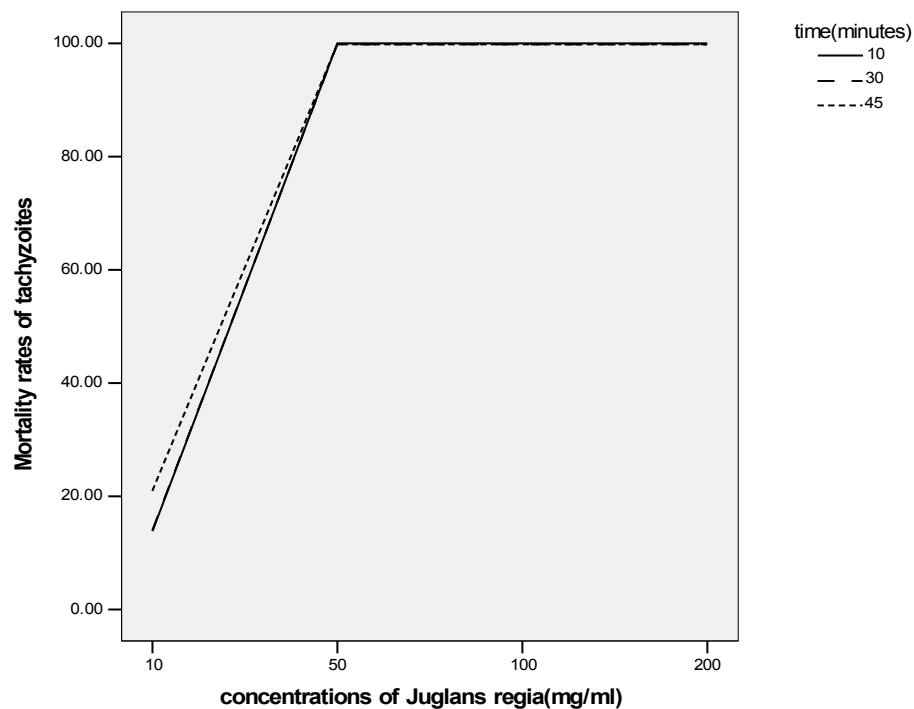
بررسی اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره های گیاهی کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو، آزاد درخت و اسپند در *In vitro*

جدول 3. میانگین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف

عصاره اتانولی گیاه برگ گردو در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت عصاره برگ گردو (میلی گرم/میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)
10	50	100	200	
13±3/9	100	100	100	10
14/10±5/53	100	100	100	30
21/10±7/51	100	100	100	45

میزان کشندگی عصاره برگ گردو در غلظت 10 میلی گرم/ میلی لیتر با افزایش مدت زمان انکوباسیون ،
افزایش معنی دار را نشان داد ($P<0.001$).



شکل 3: میزان مورتالیتی تاکي زوئیت ها در غلظت های 10، 50، 100 و 200 میلی گرم در میلی لیتر عصاره برگ گردو در مدت زمان 10، 30 و 45 دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.

میزان مورتالیتی تاکي زوئیت های مجاورت یافته با عصاره آزاددرخت: میزان مورتالیتی تاکي زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت مختلف آزاددرخت در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول 4 و شکل 4 نشان داده شده است.

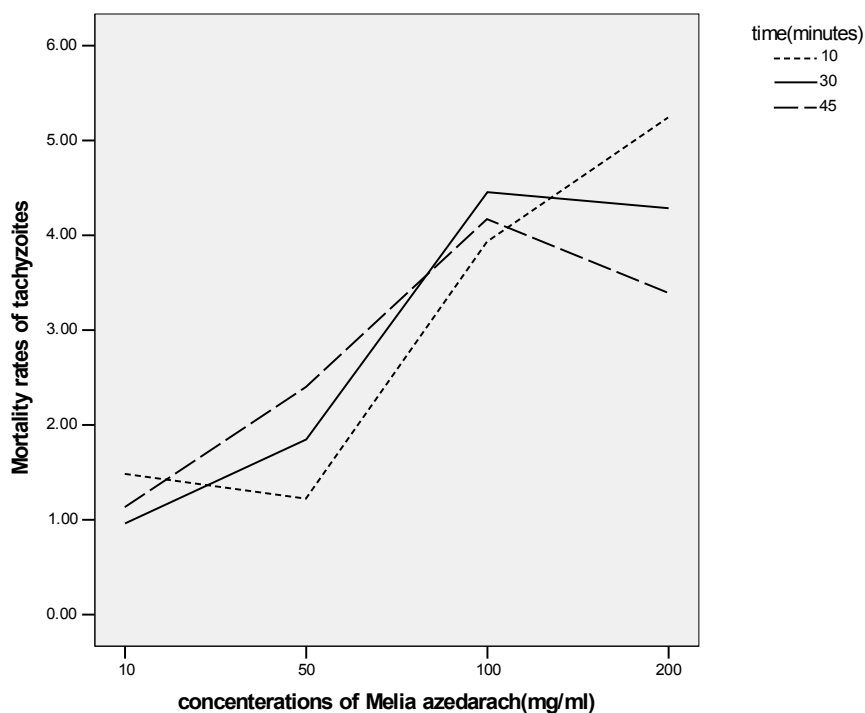
جدول 4. میانگین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف

عصاره اتانولی گیاه آزاد درخت در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت عصاره آزاد درخت (میلی گرم/میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)
10	50	100	200	
0/9 ± 0/91	1/22 ± 1/11	3/9 ± 2/5	3/39 ± 2/21	10
1/13 ± 1/05	1/84 ± 2/53	4/17 ± 1/9	4/28 ± 2/1	30
1/48 ± 1/04	2/40 ± 2/44	4/45 ± 1/90	5/24 ± 3/4	45

میزان کشندگی با غلظت ثابت عصاره در مدت زمان های مختلف تفاوت معنی دار نشان نداد ولی با مدت

زمان ثابت انکوباسیون در غلظت های مختلف درصد کشندگی تفاوت معنی دار نشان داد ($P < 0.001$).



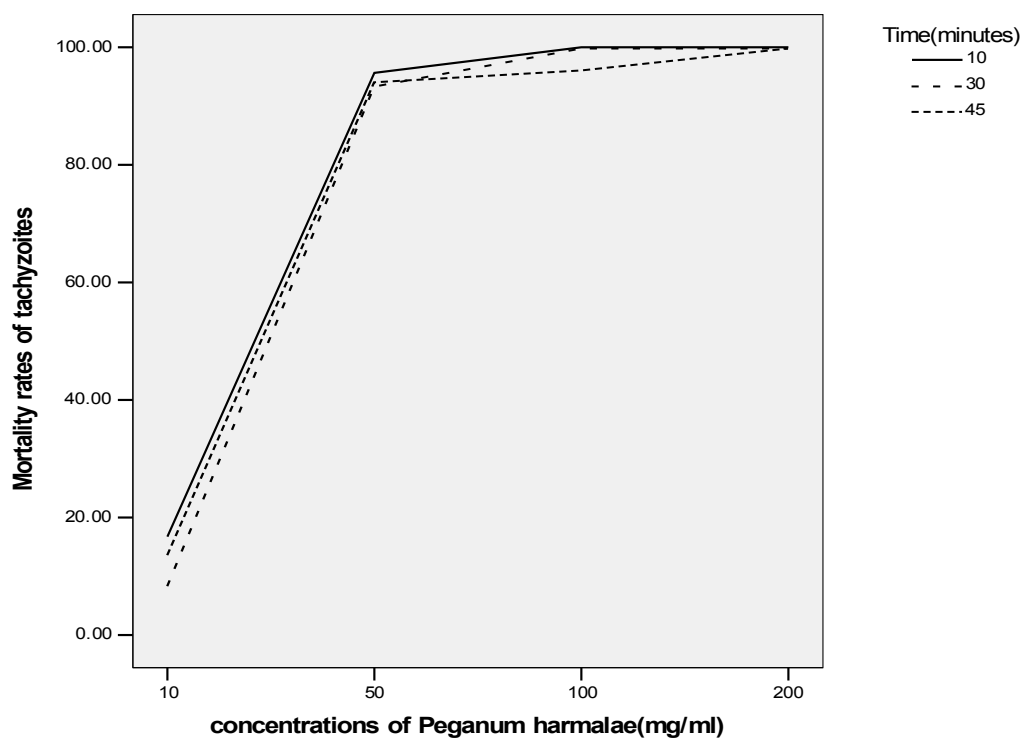
شکل 4. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های 10، 50، 100 و 200 میلی گرم در میلی لیتر عصاره آزاد درخت در مدت زمان 10، 30 و 45 دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه.

میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت یافته با عصاره اسپند: میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با غلظت مختلف اسپند در سه مدت زمان انکوباسیون در جدول 5 و شکل 5 نشان داده شده است.

جدول 5. میانگین میزان مورتالیتی تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای مجاورت داده شده با غلظت های مختلف عصاره اتانولی گیاه اسپند در مدت زمان های مختلف انکوباسیون در شرایط برون تنی عاری از سلول

غلظت عصاره اسپند (میلی گرم/میلی لیتر)				مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)
10	50	100	200	
8/47± 1/23	93/52 ± 2/31	100	100	10
13/75 ± 12/12	93/52 ± 2/31	100	100	30
16/74 ± 7/30	95/65±1/67	100	100	45

میزان کشندگی در غلظت های 50 و 10 با افزایش زمان انکوباسیون افزایش معنی داری نشان داد ($P<0.05$) ولی بین غلظت های 10 و 50 در زمان های ثابت انکوباسیون تفاوت معنی داری وجود نداشت.



شکل 5. میزان مورتالیتی تاکی زوئیت ها در غلظت های 10، 50، 100 و 200 میلی گرم در میلی لیتر عصاره اسپند در مدت زمان 10، 30 و 45 دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه

نتایج آزمون تعقیبی توکی در مقایسه بین انواع عصاره ها در جدول 6 نشان داده شده است.

جدول 6. نتایج آزمون تعقیبی توکی در مقایسه چند گانه

عصاره	کاکوتی	برگ گردو	زنجبیل	آزاددرخت
اسپند	S	NS	NS	S
کاکوتی		S	S	NS
برگ گردو			S	S
زنجبیل				S

S: sig ($P < 0.05$) ; NS: no sig

نتایج زیست سنجی در موش:

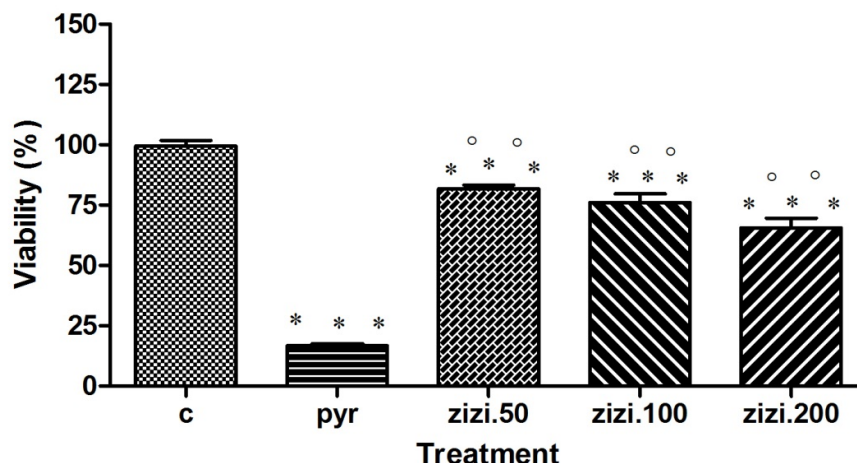
تاکی زوئیت هایی که در محیط عاری از سلول با عصاره ها مجاورت داده شده بودند و به روش رنگ آمیزی با متیلین بلو 100 درصد مرگ و میر داشتند، پس از زیست سنجی در موش ها، تمامی آنها تا یک ماه پس از تلقیح زنده ماندند که تایید 100 درصد مرگ و میر تاکی زوئیت ها بود.

اثر مهار عصاره های گیاهی بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما در کشت سلولی: هر سه عصاره کاکوتی، برگ گردو و اسپند دارای اثر مهار بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما در کشت سلولی بودند. EC50 و Selectivity هر یک از این عصاره ها بر تاکی زوئیت ها در جدول شماره 6 و شکل های 6-8 نشان داده شده است.

جدول 7. اثر مهار عصاره های اتانولی گیاهان کاکوتی، برگ گردو و اسپند بر تاکی زوئیت های توکسوپلازما گوندی ای در کشت سلولی HeLa

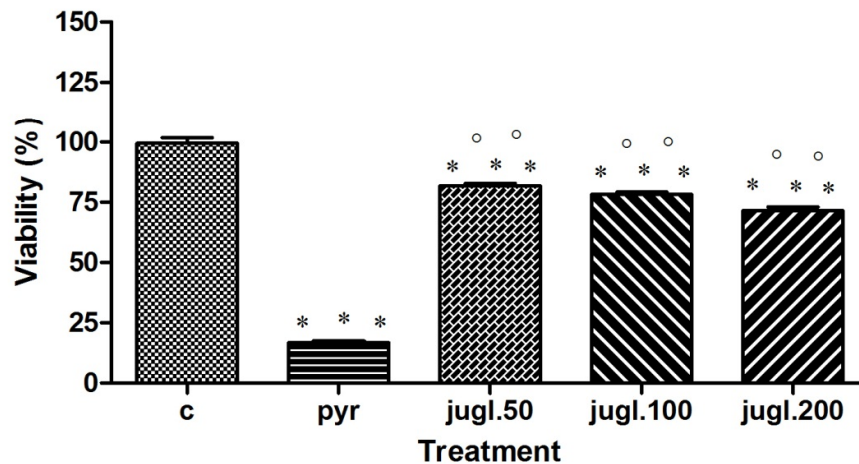
Herbal Extract/Drug	EC50 (µg/ml)		Selectivity ^a
	HeLa	HeLa + TOXO	
کاکوتی (<i>Ziziphora Tenuior</i>)	133.2	154.7	0.86
برگ گردو (<i>Juglans regia</i>)	162	207.4	0.78
اسپند (<i>Peganum harmala</i>)	93.74	179.1	0.52
Pyrimethamine	0.6	0.176	3.40

EC50, median effective concentration; ^a= Ratio of the EC50 value for HeLa cells to the EC50 value for *T. gondii* RH strain.



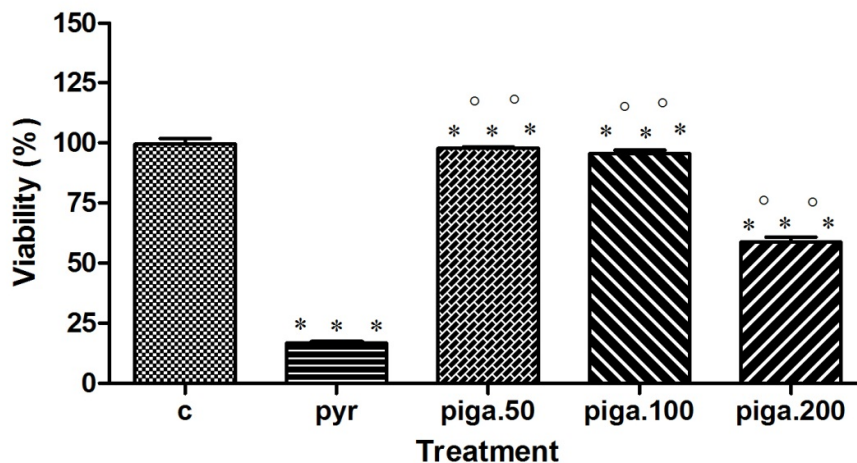
شکل 6. مقایسه میزان ویابیلیتی تاکی زوئیت ها در کشت سلولی Hela در غلظت های مختلف عصاره های کاکوتی و داروی پیریمتامین در مقایسه با کنترل. C = کنترل (سلول هلا + تاکی زوئیت)؛ Pyr = پیریمتامین (1µg/ml)؛ zizi = کاکوتی در غلظت های 50, 100, 200 µg/ml؛ $P < 0.001$ ***، مقایسه گروه ها با کنترل؛ $P < 0.001$ °°، مقایسه میان غلظت های مختلف عصاره کاکوتی با داروی پیریمتامین.

همانطور که در شکل 6 نشان داده شده است، عصاره کاکوتی به صورت وابسته به دوز در غلظت های 50-200 میکروگرم ویابیلیتی سلول هلا آلوده به تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل (سلول هلا+تاکی زوئیت) به صورت معنی دار کاهش داد ($P < 0.001$). همچنین پیریمتامین ویابیلیتی سلول هلا به همراه تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی دار کاهش داد ($P < 0.001$).



شکل 7. مقایسه میزان ویابیلیتی غلظت های مختلف عصاره های برگ گردو و داروی پیریمتامین در سلول های هلا آلوده به تاکی زوئیت توکسوپلاسم در مقایسه با کنترل. C = کنترل (سلول هلا + تاکی زوئیت)؛ Pyr = پیریمتامین ($\mu\text{g/ml}$)؛ jugl = برگ گردو در غلظت های 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ ؛ *** $P < 0.001$ ، مقایسه گروه ها با کنترل؛ °° $P < 0.001$ ، مقایسه غلظت های مختلف عصاره برگ گردو با داروی پیریمتامین

همانطور که در شکل 7 نشان داده شده است، عصاره برگ گردو به صورت وابسته به دوز در غلظت های 50-200 میکروگرم ویابیلیتی سلول هلا آلوده به تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل (سلول هلا+تاکی زوئیت) به صورت معنی دار کاهش داد ($P < 0.001$). همچنین پیریمتامین ویابیلیتی سلول هلا به همراه تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی دار کاهش داد ($P < 0.001$).



شکل 8. مقایسه میزان ویابیلیتی غلظت های مختلف عصاره اسپند و داروی پیریمتامین در سلول های هلا آلوده به تاکی زوئیت توکسوپلاسمما در مقایسه با کنترل. C = کنترل (سلول هلا + تاکی زوئیت)، Pyr = پیریمتامین ($\mu\text{g/ml}$)؛ piga = اسپند در غلظت های 200, 100, 50 $\mu\text{g/ml}$ ؛ $P < 0.001^{***}$ ، مقایسه گروه ها با کنترل، $P < 0.001^{\circ\circ}$ ، مقایسه میان غلظت های مختلف عصاره اسپند با داروی پیریمتامین

همانطور که در شکل 8 نشان داده شده است، عصاره اسپند به صورت وابسته به دوز در غلظت های 200-50 میکروگرم ویابیلیتی سلول هلا آلوده به تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل (سلول هلا+تاکی زوئیت) به صورت معنی دار کاهش داد ($P < 0.001$). همچنین پیریمتامین ویابیلیتی سلول هلا به همراه تاکی زوئیت را در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی دار کاهش داد ($P < 0.001$).

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه گیاه آزاد درخت در غلظت ها و زمانهای مواجهه مختلف تاثیر چندانی در کشندگی تاکی زوئیت های توکسوپلاسمما نداشت. در حالیکه هر چهار عصاره کاکوتی، زنجبیل، برگ گردو و اسپند بر تاکی زوئیت های توکسوپلاسمما اثر کشندگی داشتند، منتهی اثر کشندگی عصاره های برگ گردو و اسپند بیشتر از کاکوتی و عصاره کاکوتی بیشتر از زنجبیل بود. اثر کشندگی همه اینها به طور قابل توجهی بیشتر از آزاد درخت بود. در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است که انواع عصاره های گیاهی با درجات مختلف دارای اثرات مهاری یا کشندگی بر تاکی زوئیت های توکسوپلاسمما می باشند. به طوری که در مطالعه Youn و همکاران (2003) فعالیت ضد توکسوپلاسمایی 5 عصاره الکلی گیاهی شامل، *Sophora flavescens* (گونه ای از تلخ بیان)، *Pulsatilla koreana* (گو نه ای از بادلرزان)، *Torilis japonica* (گونه ای از هویج)، *Ulmus macrocarpa* (گونه ای از نارون) و *Sinomenium acutum* (نوعی گیاه بومی درچین وژاپن) بر تاکی زوئیت های توکسوپلاسمما گوندی ای و نئوسپورا کانینوم در مقایسه با سولفادیازین در محیط کشت سلولی ارزیابی شد که عصاره های *T. Japonica* و *S. flavescence* مهار کننده های بهتری برای هر دو انگل بودند (50). در مطالعه Jones-Brando و همکاران (2006) چهار تا از مشتقات جدید آرتیمی سینین درمنه (*Artemisinin*) اثر مهاری بر توکسوپلاسمما داشتند و اثر مهاری یکی از مشتقات حداقل دو برابر کمتر از بقیه بود (51). در مطالعه Jiang و همکاران (2008)، اولئورپین (*Oleuropein*) جدا شده از گیاه زبان گنجشک (*Fraxinus rhychophylla*) اثر ضد توکسو پلاسمما خوبی در *in vitro* نشان داد. به طوری که selectivity اولئورپین (8/9) به مراتب از سولفادیازین (3/8) و پریمتامین (2/5) بیشتر بود (54). در مطالعه Kavitha و همکاران (2012) اثر ضد توکسوپلاسمایی چهار فراکشن عصاره ریشه گیاه *Eurycoma longifolia* jack در کشت سلولی *Vero cells* مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه از سویه RH توکسوپلاسمما و غلظت های نهایی 100-1/56 میکروگرم در میلی لیتر فراکشن ها و کلیندامایسین استفاده شد و میانگین

غلظت موثره ($\text{Effective Concentration} = \text{EC}_{50}$) تعیین گردید. بر اساس نتایج این مطالعه، همه نمونه ها اثر کشندگی بر توکسوپلازما داشتند و بیشترین اثر کشندگی مربوط به فراکشن TAF 355 بود. EC_{50} برای کلیندامایسین، 0/016 و برای TAF 355، 0/369 بود. همچنین، اثر مهار کنندگی فراکشن های TAF 355 و TAF 401 با افزایش غلظت، افزایش نشان داد (57). در مطالعه Chen و همکاران (2008) فعالیت ضد توکسوپلاسمایی عصاره اتری گیاه جینکو (*Ginkgo biloba sarcotestas*) به نام GAS (*ginkgolic acid*) در *in vitro* در محیط کشت سلولی human foreskin fibroblast (HFF) ارزیابی شد. اثر GAS در مقایسه با آزیترومایسین در غلظت های 3/13 تا 100 میکروگرم در میلی لیتر بررسی شد. در این مطالعه غلظت ایمن آزیترومایسین (میزان تکثیر 90٪) برای 24 و 48 ساعت انکوباسیون به ترتیب 167/1 و 115/2 میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. توکسیسیته GAS برای سلول های HFF کمتر از آزیترومایسین بود. به طوری که غلظت GAS برای میزان تکثیر 90٪ بعد از 24 و 48 ساعت انکوباسیون به ترتیب غلظت های 172 و 154/6 میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. در این مطالعه از $[\text{H}^3]\text{-Leu}$ و $[\text{H}^3]\text{-TdR}$ برای ارزیابی DNA توکسوپلازما و سنتز پروتئین استفاده شد. GAS قادر بود در تمامی غلظت ها هم سنتز DNA و هم سنتز پروتئین توکسوپلازما را در روش وابسته به زمان مهار کند (59). در مطالعه Choi و همکاران (2008)، فعالیت ضد توکسوپلاسمایی عصاره های متانولی 15 گیاه دارویی بر تاکی زوئیت های سویه RH توکسوپلازما در محیط کشت سلولی Hella در مقایسه با پریمتامین بررسی شد. در این مطالعه عصاره های شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.)، اگیر ترکی (*Acorus gramineus* Soland) و سرخس نر (*Dryopteris crassirhizoma*) بیشترین فعالیت ضد توکسوپلاسمایی داشتند ($\text{EC}_{50} = 0.11\text{-}0.15 \text{ mg/ml}$)، اما توکسیسیته انتخابی نداشتند ($\text{Selectivity} = 1.7\text{-}2.5$). تلخ بیان (*Sophora flavescens* Aiton) فعالیت ضد توکسوپلاسمایی ($\text{EC}_{50} = 0.20 \text{ mg/ml}$) و توکسیسیته انتخابی بالایی ($\text{Selectivity} = 4.6$) نشان داد. همچنین،

Zingiber officinale (زنجبیل) دارای فعالیت بالای ضد توکسوپلاسمایی ($EC_{50} = 0.18 \text{ mg/ml}$) و سیتوتوکسیسیته آن در مقابل سلول های HeLa ($EC_{50} = 1.81 \text{ mg/ml}$) بود. زنجبیل فعالیت قوی ضد توکسوپلاسمایی ($Selectivity = 10.1$) نسبت به پریمتامین ($Selectivity = 2.1$) و اسپیرامایسین ($Selectivity = 2.5$) نشان داد (60). اثرات آنتی بیوتیکی عصاره های گیاهی مربوط به ترکیبات موثره ای است که در آنها وجود دارد. بالاتر بودن اثر کشندگی عصاره های برگ گردو و اسپند و کاکوتی نسبت به آزاد درخت احتمالاً مربوط به تفاوت ترکیبات اصلی این عصاره هاست. مطالعاتی که در زمینه شناسایی ترکیبات اصلی این گیاهان انجام شده، نشان دهنده این تفاوت هاست. به طور مثال، در مطالعه توکلی و همکاران در سال 1390 فعالیت های آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانی و ضد قارچی روغن اصلی گیاه کاکوتی را مربوط به pulegone (پولگون) دانستند (82). در مطالعه ای که توسط آستولا و همکاران (2008) گزارش شد عصاره الکلی دانه های اسپند در موشهای رت دارای اثر مهار کنندگی بر پلاسمودیم فالسی پاروم بود (90). ترکیبات اصلی انواع *Artemisia* شامل ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، کومارین ها، کافئولکواینیک اسید و استرول ها است و به عنوان یک منبع مهم ترکیبات بیولوژیک در تهیه حشره کش ها، داروی ضد مالاریا، قارچ کش ها و ضد باکتری ها استفاده می شود. آرتیمی سینین (*Artemisinin*) که یک داروی بسیار موثر ضد مالاریاست منشاء گیاهی دارد و از گونه *A. annua* بدست آمده است (101).

در سال 2011، Tariku و همکاران گزارش کردند که افسنتین در غلظت های مناسب دارای خاصیت قوی ضد لیشمانیایی است (102). در مطالعه Patricia و همکاران (2005) در برزیل اثرات ضد لیشمانیایی 19 عصاره گیاهی از جمله بومادران و فلفل بر روی انگل لیشمانیا آمازونینسیس و تریپانوزوما کروزو به صورت *in vitro* ارزیابی شد. درصد مهار رشد عصاره این گیاهان از 49/5٪ تا 99٪ متفاوت بود (103). طباطبایی یزدی و همکاران در سال 2013 اثر آنتی میکروبیال عصاره گیاهانی از جمله کاکوتی، آویشن شیرازی و گونه ای از نعنای را روی اشرشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس بررسی نموده و

مشاهده کردند که قطر هاله عدم رشد گیاه کاکوتی در مقابل استافیلوکوک در غلظت های 10، 20، 30 و 40 درصد به ترتیب 9/1، 11/2، 13/2، 16/4 و در مقابل اشرشیا کلی به ترتیب 6/6، 11/9، 7، 12/7 میلی متر بود. با توجه به نتایج ذکر شده، عصاره گیاه مذکور در غلظت های بالاتر اثر بیشتری روی باکتری ها داشت (104). در این مطالعه محققین دلیل اثرات گیاهان مورد نظر را وجود ترکیب تیمول ارزیابی کردند در تحقیق حاضر نیز اثر عصاره گیاه مورد نظر وابسته به غلظت بود و با افزایش غلظت، میزان کشندگی انگل نیز افزایش یافت که به احتمال زیاد به دلیل غلظت زیاد ماده تیمول در غلظت های بالاتر عصاره باشد. وردیان و همکاران، در سال 2008 اثر اسانس گیاه کاکوتی کوهی در مقابل حشرات را مورد بررسی قرار داد و مشاهده کرد که اسانس این گیاه دارای فعالیت لاروکشی بوده و با افزایش غلظت میزان این اثر افزایش می یابد (25). در تحقیق ما نیز با بالارفتن غلظت، اثر کشندگی روی انگل افزایش یافت بطوریکه این گیاه در غلظت 100 و 200 میلی گرم اثر کشندگی خوبی روی انگل داشت ولی در غلظت 50 و 10 میلی گرم بر میلی لیتر این اثر کاهش چشمگیری داشت. در سال 2011 سلطانی نژاد که اثر آنتی باکتریال اسانس گیاه کاکوتی کوهی را روی بعضی باکتری ها بررسی نمود، مشاهده کرد که باکتری سودوموناس به اسانس گیاه مذکور مقاوم بوده ولی باکتری لیستریا کاملاً حساس بود و به طور کامل در مقابل اسانس آن از بین رفت، در حالیکه بقیه باکتری های مورد آزمایش به نسبت های متفاوت تحت تاثیر اسانس قرار گرفتند که این اختلاف ممکن است به دلیل تفاوت نوع ساختمان میکروارگانیسم ها باشد. همچنین وجود ماده پولگون در این عصاره نیز یکی از دلایل از بین رفتن باکتری ها گزارش شد (105). اثر آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی گیاه کاکوتی کوهی توسط امیری و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان IC50 در عصاره و اسانس به ترتیب 21/4 و 55/3 درصد بود و می توان گفت که گیاه مذکور به طور قابل توجهی میزان رادیکال های آزاد را کاهش داد، اثرات آنتی اکسیدانی گیاه کاکوتی احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات پلی فنل، فلاون ها و فلاونوئیدها باشد (106). در بررسی شاهوردی و همکاران (2014) اثرات ضد

میکروبی ترکیبات دود دانه های اسپند را به دلیل ماده harmine (هارمین) دانستند (107). در تحقیقات دیگری اثرات ضد توموری و ضد پلاسمودیومی عصاره اتانولی اسپند را بدلیل ترکیبات آلکالوئیدی این گیاه دانستند (108). در یک مطالعه (2015) اثرات ضد میکروبی و ضد عفونی کننده ی عصاره اتانولی اسپند با بتادین مقایسه شد و تاثیر عصاره دانه اسپند در بهبود زخم در غلظت 50 میلی گرم بر میلی لیتر بیشتر و سریعتر از بتادین بود. این اثر را به دلیل وجود ترکیبات آلکالوئیدی در دانه اسپند دانستند (109). در مطالعه ی دیگری در سال 2004 اثر ضد لیشمانیایی اسپند را به دلیل وجود ترکیبات beta-carboline alkaloids harmine, harmaline, در این گیاه دانستند و دیدند این گیاه باعث مهار رشد آماسیگوته‌ها و پروماستیگوته‌های انگل لیشمانیا اینفنتوم در محیط کشت سلولی مونوسیته‌ها می شود (110). در مطالعه Carvalho (2010) بر روی عصاره های مختلف برگ گردو تاثیرات ضد توموری و آنتی اکسیدانی این گیاه را به دلیل ترکیبات phenolic (فنلیک) این گیاه دانستند که این تاثیر در عصاره متانولی برگ گردو بیشتر بود (111). در مطالعه دیگری در سال 2007 اثرات آنتی باکتریال عصاره اتانولی برگ گردو را به دلیل ترکیبات فلاونوئیدی 3- and 4-p-caffeoylquinic acids, 3- and 4-p-coumaroylquinic acids, p-coumaric acid, quercetin 3-galactoside, quercetin 3-pentoside derivative, quercetin 3-arabioside, quercetin 3-xyloside and quercetin 3-rhamnoside. دانستند (112).

در مطالعه حاضر برای تایید 100٪ اثر کشندگی عصاره ها بر تاکی زوئیت های سویه RH توکسوپلازما از روش زیست سنجی در موش استفاده شد. به طور معمول برای نشان دادن اثر کشندگی عصاره ها و یا داروها بر تاکی زوئیت ها از رنگ آمیزی با رنگ تریپان بلو و یا متیلین بلو انجام می شود. با رنگ آمیزی اولی تاکی زوئیت های زنده و با دومی تاکی زوئیت های مرده رنگ می گیرند. استفاده از روش زیست سنجی در موش در طراحی اولیه مطالعه ما لحاظ نشده بود ولی مشاهداتی که طی یک تجربه جداگانه

بدست آمد، ما را بر آن داشت که از این روش برای تایید اثر کشندگی عصاره ها به روش رنگ آمیزی استفاده کنیم. در این تجربه تاکی زوئیت ها با یکی از عصاره های گیاهی (غیر از عصاره های مورد مطالعه) مجاورت داده شدند و پس از رنگ آمیزی با متلین بلو تمامی تاکی زوئیت ها بدون رنگ باقی ماندند که دلالت بر مرده بودن آنها داشت ولی ساختار میکروسکوپی آنها محفوظ باقی ماند که دلالت بر زنده بودن آنها داشت. بنابر این چنین فرض شد که ممکن است برخی عصاره های گیاهی بر رنگ پذیری تاکی زوئیت ها اثر داشته باشند. به همین جهت به منظور مخدوش نشدن نتایج مطالعه حاضر از روش زیست سنجی در موش به عنوان یک روش تاییدی استفاده شد. با توجه به محدودیت های اجرایی، در مطالعه حاضر تنها در مواردی از روش زیست سنجی استفاده شد که به روش رنگ آمیزی با متلین بلو 100٪ تاکی زوئیت ها مرده تشخیص داده شدند. در روش زیست سنجی، اگر یک تاکی زوئیت نیز زنده مانده باشد، قادر است در عرض کمتر از 2 هفته موش را بکشد. در مطالعه ما تمامی موش هایی که تحت تجربه زیست سنجی بودند، تا یک ماه تحت نظر بودند و تماماً زنده باقی ماندند که موید 100٪ کشته شدن تاکی زوئیت های مجاورت داده شده با عصاره ها بود.

یکی از کاربردهای احتمالی عصاره های گیاهان دارویی با اثر ضد توکسوپلاسمایی، می تواند استفاده از آنها برای پیشگیری از توکسوپلاسموز مادرزادی و یا پیشگیری از فعال شدن مجدد توکسوپلاسموز در بیماران با اختلال یا تضعیف ایمنی باشد. جنین مادران سرونکاتیو توکسوپلاسم، مبتلایان به ایدز و افراد تحت درمان داروهای سرکوب کننده ایمنی گروه های در معرض خطر بالای توکسوپلاسموز می باشند. پیشگیری از توکسوپلاسموز در این افراد بسیار اهمیت دارد. در حال حاضر از داروهای سنتتیک برای این منظور استفاده می شود که عوارض جانبی، مهمترین عامل محدود کننده استفاده از این داروهاست. به نظر می رسد که دست یابی به یک فراورده های گیاهی با اثر ضد توکسوپلاسمایی می توانند جایگزین مناسب داروهای سنتتیک برای پیشگیری از توکسوپلاسموز در این افراد باشد.

نتیجه گیری:

از مطالعه حاضر نتیجه گیری می شود که چهار عصاره ی مورد بررسی اثر کشندگی بر تاکی زوئیت ها توکسو پلازما گوندی ای داشتند. این اثر برای برگ گردو، اسپند و کاکوتی از زنجبیل بیشتر بود. اثر ضد توکسوپلاسمایی عصاره ها وابسته به دوز بود تا وابسته به مدت زمان انکوباسیون. همچنین اثر بخشی عصاره گیاهان مورد مطالعه در مقایسه با داروی پیریمتامین به مراتب کمتر بود.

پیشنهادهات:

1. مطالعات تکمیلی با استفاده از فراکشن عصاره های کاکوتی، برگ گردو و اسپند که دارای اثر بخشی بیشتری بودند، انجام گیرد.
2. مطالعات *In vivo* اثر بخشی عصاره های کاکوتی، برگ گردو و اسپند با استفاده از سویه های ویرولان و غیر ویرولان توکسوپلازما انجام گیرد.

منابع (References)

1. Montoya JG, Boothroyd JC, Kovacs JA. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dol-in R, editors. Mandell, Douglas, Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2010; p: 3495-526.
- 2- ادریسیان غ، رضائیان م، قربانی م، کشاورز ح، محبعلی م. تک یاخته شناسی پزشکی. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران. 1386، 139-162.
3. John C. Boothroyd. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. Int J Parasito. 2009; 39: 935-946. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.02.003.
4. Larry S. Roberts John Janovy JR. Gerald D, Schmidt, Larry S. Roberts' foundations of parasitology. McGraw-Hill Companies, New York. 2009; p: 43-60.
5. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clinical Microbiology Reviews. 1998; 11: 267-299.
6. Daryani Kalani H, Sharif M, Ziaei H, Sarvi Sh, Ahmadpour E. *Toxoplasma gondii*: A review of excretory secretory antigens. J Mazand Univ Med Sci. 2013; 23: 220-232.
7. Hill D and Dubey J. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clinical Microbiology and Infection. 2002; 8: 634-640.
8. Chinchilla M, Ruiz A. Cockroaches as possible transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. J Parasitol. 1976; 62: 140-2.
9. Kortbeek LM, Demelker HE, Veldhuijzen IK, Conyn-Van Spondonck MA. Population seroprevalence study in The Nether lands. Epidemiol Infect. 2004; 132: 839-45.
10. De Melo EJ, de Souza W. A cytochemistry study of the inner membrane complex of the pellicle of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasitology Research. 1997; 83: 252-256.
11. Agmas B, Tesfaye R, Koye DN. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection and associated risk factors among pregnant women in Debre Tabor, Northwest Ethiopi. BMC Res Notes. 2015; 8: 107. Doi: 10.1186/s13104-015-1083-2.

12. Gyang VP, Akinwale OP, Lee YL, Chuang TW, Orok A, Ajibaye O, Liao CW, Cheng PC, Chou CM, Huang YC, Fan KH, Fan CK. Toxoplasma gondii infection: seroprevalence and associated risk factors among primary schoolchildren in Lagos City, Southern Nigeria. Rev Soc Bras Med Trop. 2015; 48: 56-63.
13. Mahmoudvand H, Saedi Dezaki E, Soleimani S, Baneshi MR, Kheirandish F, Ezatpour B, Zia-Ali N. Seroprevalence and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among healthy blood donors in southeast of Iran. Parasite Immunol. 2015. doi: 10.1111/pim.12198.
14. Saki J, Mohammadpour N, Moramezi F, Khademvatan S. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in women who have aborted in comparison with the women with normal delivery in Ahvaz, southwest of Iran. Scientific World Journal. 2015. doi: 10.1155/2015/764369.
15. Yad Yad MJ, Jomehzadeh N, JafarSameri M, Noorshahi N. Seroprevalence of Anti-Toxoplasma gondii antibodies among pregnant woman in south Khuzestan, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2014; 7: e9998. doi: 10.5812/jjm.9998.
16. Hajsoleimani F, Ataieian A, Nourian A, Mazloomzadeh S. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in pregnant women and bioassay of IgM positive cases in Zanjan, northwest of Iran. Iran J Parasitol. 2012; 7: 82-6.
17. Hashemi HJ, Saraei M. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in unmarried women in Qazvin, Islamic Republic of Iran. East Mediterr Health J. 2010; 16: 24-8.
18. صفار م ج، عجمی ا، مسلمی زاده ن. بررسی شیوع آلودگی توکسوپلازما گوندی در خانم های باردار شهرستان ساری. مجله علمی پژوهشی دانشگاه مازندران، 1378: شماره 24، 5-1.
19. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00205>
20. Trevor AJ, Katzung BG, Kruidering-Hall M, Masters SB. Katzung and Trevor's Pharmacology examination and board review. 10 ed. New York. Mc Graw Hill. 2013; P: 451-459.

21. Johanson JS, Holliman RE. Toxoplasmosis. In: Gillespie SH, Hawkey PM. (editors). Medical Parasitology: A practical approach. New York: Oxford University Press Inc. 1995; p: 33-59.
22. صمصام شریعت ه. تجزیه و شناسایی مواد دارویی گیاهی به روش میکروسوپی و کروماتوگرافی. چاپخانه فرهنگ معاصر. چاپ اول، 1382.
23. زرگری ع. گیاهان دارویی، جلد دوم، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، 1370، شماره انتشار 1810/1 صفحات 9-5.
24. رحیمی نیام. فرهنگ مصور گیاهان دارویی، انتشارات اشکذر. چاپ سوم. 1390.
25. Verdian-rizi M. Essential oil composition and biological activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. from Iran. Am Eurasian J Agric Sci. 2008; 2: 69-71.
26. والنت ژ، امامی ا، شمس اردکانی م ر، نکوئی ن. ترجمه گیاه درمانی، درمان بیماری ها توسط گیاهان، انتشارات راه کمال. 1381.
27. Dehkordi H S, Iranpour Mobarakeh H, Dehkordi HM, Jafarian M and Khamesipour F. Studying the effect of the *Ziziphora tenuior* L. plant on some biochemical factors of serum in rat. International Journal of Biology. 2014; 6: 131-135.
28. مهربان سنگ آتش م، کاراژیان ر، بیرقی طوسی ش. مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*) بر باکتری های مولد فساد و بیمار یزای مواد غذایی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران. دوره 4. شماره 3، پاییز 1386: 9-13.
29. زرگری ع، گیاهان دارویی، جلد چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران 1372. صفحه 969.
30. Talebi M, Rezakhanlou A, Salahi G. An ecological review scholars research library annals of biological research. Isfahani trichomes plasticity in *Ziziphora tenuior* L. (Labiatae) in Iran. 2012; 3: 668-672.

31. Najafi F, Tavakkoli Z. Comparing essential oil composition and antibacterial effects of *Ziziphora tenuior* L. in two regions of Iran. Iranian Journal of medicinal and aromatic plants. 2011; 2: 239-248.
32. Duru ME, Ozturk M, Ceylan O. The constituents of essential oil and in vitro antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. Journal of Ethnopharmacology. 2003; 94: 43-48.
33. Sattar NA, Hussain F, Iqbal T. Antioxidant activities of *Z. officinale* Roscoe and *A. allughas* Rosc(Zingiberaceae) rhizomes. Bangladesh J. Sci. Ind. Res. 2013; 48: 115-118.
34. Shimoda H, Shan SJ, Tanaka J, Seki A, Seo JW, Kasajima N, Tamura S, Ke Y, Murakami N. Anti-inflammatory properties of red ginger (*Zingiber officinale* var. *Rubra*) extract and suppression of nitric oxide production by its constituents J Med Food. 2010; 13: 156-62.
35. Moazeni M, Nazer A. In vitro lethal effect of *Zingiber officinale* R. on protoscolices of hydatid cyst from sheep liver. Microbiol Res 2011; 2: 91-94.
36. Banerjee S, Mullick HI, Banerjee J. *Zingiber Officinale*: A natural gold international journal of pharma and bio sciences review article. 2011; 12: 283-294.
37. Meneceur P, Bouldouyre MA, Aubert D, Villena I, Menotti J, Sauvage V, Garin, JM and Derouin F. In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2008; 52(4): 1269-1277.
38. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira IC, Ferreres F, Bento A, Seabra R, Estevinho L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: Phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food Chem Toxicol. 2007; 45: 2287-95.

39. اسمت پ، کنستانتین ک، هانسل رودولف ه، چاندلر ف. عوارض جانبی داروهای گیاهی. ترجمه محسن تفقیدی. چاپ سوم. مشهد: انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، 1383: ج2. ص 103.
40. Tsuchiya HM, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, Tanaka T, Iinuma M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 1996; 50: 27-34.
41. Mishra G, Jawla S, Srivastava V. *Melia Azedarach*: A review article. *International Journal of medicinal chemistry & Analysis Garima Mishra. IJMCA.* 2013; 3: 53-56.
42. Azam M, Mamun-Or-Rashid AN, Towfique N, Sen M, Nasrin S. Pharmacological potentials of *Melia azedarach* L. A review *american journal of bioScience.* 2013; 1: 44-49.
43. Jafari S, Saeidnia S, Hajimehdipour H, Shams Ardekani MR, Faramarzi MA, Hadjiakhoondi A, Khanavi M. Cytotoxic evaluation of *Melia azedarach* in comparison with, *Azadirachta indica* and its phytochemical investigation. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2013; 21: 1-7. Doi:10.1186/2008-2231-21-37.
44. Sen A, Batra A. Chemical composition of methanol extract of the leaves of *Melia azedarach*. *Asian J Pharma Clin Res.* 2012; 5: 42-45.
45. زرگری ع، گیاهان دارویی، جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران 1372. صفحه 529.
46. عقیلی خراسانی. مخزن الادویه. انتشارات و آموزش انقلاب اسلامی. تهران 1371. صفحه 441.
47. Shi CC, Liao JF, Chen CF. Comparative Study on the vasorelaxant effects of three harmala alkaloids in vitro. *Japanese J Pharmacol.* 2001; 85: 299-305.
48. Rifaie El, Saad ME. Uses of *Peganum harmala* in certain dermatoses. *Int. J. Dermatol.* 1982; 19: 221-2.

49. Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46: 1163-73.
50. Youn HJ, Lakritz J, Kimc D, Rottinghaus G, Marsh A. Anti-protozoal efficacy of medicinal herb extracts against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. 2003; 116: 7-14.
51. Jones-Brando L, D'angel J, Posner G, Yolken R. In vitro inhibition of *Toxoplasma gondii* by four new derivatives of Artemisinin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006; 12: 4206-4208 .
52. Al-Zanbagi N. Effectiveness of Myrrh And Spiramycin as inhibitors for *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vivo. Mansoura J . *Forensic Med . Clin. Toxicol* . 2007; 2 : 117-127.
53. Choi W, Jiang M, Chu J. Antiparasitic effects of *Zingiber Officinale* (Ginger) extract against *Toxoplasma gondii* . *Journal Of Applied Biomedicine*. 2013; 11: 15-26.
54. Jiang JH, Jin CM, Kim YC, Kim HS, Park WC, Park H. Anti-toxoplasmosis effects of oleuropein isolated from *fraxinus rhychophylla*. *Biol. Pharm. Bull* . 2008; 31: 2273-2276.
55. de Oliveira T, Oliveira Silva D, Rostkowska C, Béla S, Ferro E, Magalhaes P, Mineo J. *Toxoplasma gondii*. Effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models in vitro and in vivo. *Experimental Parasitology*. 2009; 122: 233-41.
56. Al-Zanbagi N. In vivo effect of some home spices extracts on the *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Journal Of Family &Community Medicine*. 2009; 16(2): 59-65.
57. Kavitha N, Noordin R, Chan k-L, Sasidharan S. In vitro Anti-*Toxoplasma gondii* activity of Root extract/fractions of *Eurycoma longifolia* Jack. *BMC Complementar and Alternative Medicine*. 2012; 12: 91. Doi: 10.1186/1472-6882-12-91.
58. Youn HJ, Lakritz J, Rottinghaus GE, Seo HS, Kim DY, Cho MH, Marsh AE. Anti-protozoal efficacy of high performance liquid chromatography fractions of *Torilis japonica* and *Sophora flavescens* extracts on *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol*. 2004; 125: 409-14.

59. Chen SX, Wu L, Jiang XG, Feng YY, Cao JP. Anti-Toxoplasma gondii activity of GAS in vitro. J Ethnopharmacol. 2008; 118: 503-7.
60. Choi KM, Gang J, Yun J. Anti-Toxoplasma gondii RH strain activity of herbal extracts used in traditional medicine. Int J Antimicrob Agents. 2008; 32: 360-2.
61. Kheiri Manjili H, Jafari H, Ramazani A, Davoudi N. Anti-leishmanial and toxicity activities of some selected Iranian medicinal plants. Parasitol Res. 2012; 111: 2115-21.
62. Ramazani A, Sardari S, Zakeri S, Vaziri B. In vitro antiplasmodial and phytochemical study of five Artemisia species from Iran and in vivo activity of two species. Parasitol Res. 2010; 107: 593-9.
63. Santos AO, Santin AC, Yamaguchi MU, Cortez LE, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Nakamura CV. Antileishmanial activity of an essential oil from the leaves and flowers of Achillea millefolium. Ann Trop Med Parasitol. 2010; 104: 475-83.
64. Orhan IE, Kartal M, Gülpınar AR, Cos P, Matheeussen A, Maes L, Tasdemir D. Assessment of antimicrobial and antiprotozoal activity of the olive oil macerate samples of Hypericum perforatum and their LC-DAD-MS analyses. Food Chem. 2013; 138: 870-5.
65. El-Ansary AK, Ahmed SA, Aly SA. Antischistosomal and liver protective effects of Curcuma longa extract in Schistosoma mansoni infected mice. Indian J Exp Biol. 2007; 45: 791-801.
66. Naghibi F, Esmaeili S, Abdullah NR, Nateghpour M, Taghvai M, Kamkar S, Mosaddegh M. In vitro and in vivo antimalarial evaluations of myrtle extract, a plant traditionally used for treatment of parasitic disorders. Biomed Res Int. 2013; 316185. Dio:10.1155/2013/316185. Epop 2013 Dec 23.
67. Burt SA, Tersteeg-Zijderfeld MH, Jongerius-Gortemaker BG, Vervelde L, Vernooij JC. In vitro inhibition of Eimeria tenella invasion of epithelial cells by phytochemicals. Vet Parasitol. 2013; 191: 374-8.
68. Mojarab M, Shiravand A, Delazar A, Heshmati Afshar F. Evaluation of in vitro antimalarial activity of different extracts of Artemisia aucheri Boiss. and A. armeniaca Lam.

and fractions of the most potent extracts. ScientificWorldJournal. 2014; 825370. doi: 10.1155/2014/825370. eCollection 2014.

69. Ziegler HL, Franzyk H, Sairafianpour M, Tabatabai M, Tehrani MD, Bagherzadeh K, Hägerstrand H, Staerk D, Jaroszewski JW. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of Plasmodium falciparum growth: structure-activity relationships for betulinic acid analogues. Bioorg Med Chem. 2004; 12: 119-27.

70. Sarac N, Ugur A. The in vitro antimicrobial activities of the essential oils of some Lamiaceae species from Turkey. J Med Food. 2009; 12: 902-7.

71. Kaushik NK, Bagavan A, Rahuman AA, Mohanakrishnan D, Kamaraj C, Elango G, Zahir AA, Sahal D. Antiplasmodial potential of selected medicinal plants from eastern Ghats of South India. Exp Parasitol. 2013; 134: 26-32.

72. Cala AC, Chagas AC, Oliveira MC, Matos AP, Borges LM, Sousa LA, Souza FA, Oliveira GP. In vitro anthelmintic effect of Melia azedarach L. and Trichilia clausenii C. against sheep gastrointestinal nematodes. Exp Parasitol. 2012; 130: 98-102.

73. Rahimi-Moghaddam P, Ebrahimi SA, Ourmazdi H, Selseleh M, Karjalian M, Haj-Hassani G, Alimohammadian MH, Mahmoudian M, Shafiei M. In vitro and in vivo activities of Peganum harmala extract against Leishmania major. J Res Med Sci. 2011; 16: 1032-9.

74. Ankrah NA, Nyarko AK, Addo PG, Ofosuhen M, Dzokoto C, Marley E, Addae MM, Ekuban FA. Evaluation of efficacy and safety of a herbal medicine used for the treatment of malaria. Phytother Res. 2003; 17: 697-701.

75. Serakta M, Djerrou Z, Mansour-Djaalab H, Kahlouche-Riachi F, Hamimed S, Trifa W, Belkhiri A, Edikra N, Hamdi Pacha Y. Antileishmanial activity of some plants growing in Algeria: Juglans regia, Lawsonia inermis and Salvia officinalis. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2013; 10: 427-30.

76. Vendrametto MC, Santos AO, Nakamura CV, Dias Filho BP, Cortez DA, Ueda-Nakamura T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of Piper regnellii var. pallens. Parasitol Int. 2010; 59: 154-8.

77. Adams M, Alther W, Kessler M, Kluge M, Hamburger M. Malaria in the Renaissance: remedies from European herbals from the 16th and 17th century. *J Ethnopharmacol*. 2011; 133: 278-88.
78. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*. 1999; 86: 985-90.
79. Rota C, Carramiñana JJ, Burillo J, Herrera A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens . *J Food Prot*. 2004; 67: 1252-6.
80. Shokri H, Sharifzadeh A, Ashrafi Tamai I. Anti-Candida zeylanoides activity of some Iranian plants used in traditional medicine. *J Mycol Med*. 2012; 22: 211-6.
81. Salehi P, Sonboli A, Eftekhari F, Nejad Ebrahimi S, Yousefzadeh M. Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activity of the oil and various extracts of *Ziziphora clinopodioides rigida* from Iran. *Pharm*. 2005; 28: 1892-6.
82. توکلی ز، نجفی ف. مقایسه ترکیب های شیمیایی اسانس، غلظت عناصر موجود در خاک و خواص ضد باکتریایی گیاه کاکوتی در دو منطقه ایران. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران 1390، 48-239 .
83. Admassu Shimelis E, Kumar Rakshit S. Antinutritional factors and in vitro protein digestibility of improved haricot bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Ethiopia. *Int J Food Sci Nutr*. 2005; 56: 377-87.
84. Suhad A, Ahmed Iman I, Jabbar and Hamssah E, Abdul wahed .Study the antibacterial activity of *Zingiber officinale* roots against some of pathogenic bacteria . *Al- Mustansiriya J*. 2012; 23: 63-70.
85. Gaus K, Huang Y, Israel DA, Pendland SL, Adeniyi BA, Mahadi GB. Standardized ginger (*Zingiber officinale*) extract reduces bacterial load and suppresses acute and chronic inflammation in Mongolian gerbils infected with cagA+*Helicobacter pylori* . *Pharm Biol*. Author manuscript; available in PMC. 2009; 47: 92-8. Doi: 10.1080/13880200802448690.

86. Santos A, Barros L, Montserrat D, Carval H. Leaves and decoction of *Juglans regia* L.: Different performances regarding bioactive compounds and in vitro antioxidant and antitumor effects. *Industrial Crops and Products*. 2013; 51: 430–436.

87. Abu Taha N and Mohammed A. Al-wadaan. Utility and importance of walnut, *Juglans regia* Linn: A review. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 5(32): 2011;796-5805.

88. Khalili B, Rafieian M, Hejazi SH, Yusefi HA, Yektaian N, Shirani-Bidabadi L. Effect of *Achillea millefolium*, *Artemisia absinthium* & *Juglans regia* leaves extracts on *Trichomonas vaginalis*, in vitro. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*. 2011; 12: 62-69.

89. براتی م، شریفی ا، شریفی فر ف. بررسی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره های آویشن شیرازی، اسپند و مورد با روش رنگ

سنجی به صورت برون تنی (In vitro). *مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان*. دوره هفدهم. شماره 1. 1388: 41-32.

90. Astulla A, Zaima K, Matsuno Y, Hirasawa Y, Ekasari Y, Widyawaruyanti A, Zaini N, Morita H. Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. *Journal of Natural Medicines*. 2008; 62: 470-472.

91. Mashreghi M, Niknia S. The Effect of *Peganum harmala* and *Teucrium polium* alcoholic extracts on growth of *Escherichia coli* O157. *Jundishapur J Microbiol*. 2012; 5: 511-515.

92. Yousefi R, Ghaffarifar F, DalimiAsl A. The effect of *alkanna tincturia* and *Peganum harmala* extracts on *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER) in vitro. *Iranian J Parasitol*: 2009; 4: 40-47.

93. Khoshzaban F, Ghazanfari T, GhaffariFar F, Sharafi M, GhasemiNikoo S. Effect of *Peganum harmala* extract on acute toxoplasmosis in mice. *Daneshvar Medicine*. 2008; 15: 27-36.

94. Hammoshi MH, Shareef AY, Younis GT. Effect of ethanolic extract and crude alkaloides of *Peganum harmala* seeds on the viability of *Echinococcus granulosus* protoscolices in vitro. *Raf. Jour. Sci*. 2005; 16: 1-8.

95. Babaei Pour A, Moghadar N. Larval effect of extract of harmine and harmalin from *Peganum harmala* on juvenile of *Protostrongylus rufescens*. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2012; 7: 68.

96. Chabir N, Ibrahim H, Romdhane H, Valentin A, Moukarzel B, Mars M, Bouajila J. Seeds of *Peganum Harmala* L. chemical analysis, antimalarial and antioxidant activities, and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Med Chem*. 2014; 11: 94-101.
97. Ramya S, Jepachanderamohan PJ, Alaguchamy N, Kalayanasundaram M and Jayakumararaj R. In Vitro Antibacterial Prospective of Crude Leaf Extracts of *Melia azedarach* Linn. against Selected Bacterial Strains. *Ethnobotanical Leaflets*. 2009; 13: 254-58.
98. Zahoor M, Ahmed M, Naz S, Ayaz M. Cytotoxic, antibacterial and antioxidant activities of extracts of the bark of *Melia azedarach* (China Berry). *Nat Prod Res*. 2015; 29: 1170-2. doi: 10.1080/14786419.2014.982649.
99. Sultana S, Akhtar N, Asif HM. Phytochemical screening and antipyretic effects of hydro-methanol extract of *Melia azedarach* leaves in rabbits. *Bangladesh JPharmacol* .2013; 8: 214-217.
100. Meziane M, Goumrl H. The antimicrobial effect of extracts of *Melia Azedarach* on some pathogenic microorganisms. *International Journal of Applied and Natural Sciences (IJANS)*. 2014; 3: 173-180.
101. Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *PharmBiol*. 2011; 49: 101-9. doi: 10.3109/13880209.2010.497-815.
102. Tariku Y, Hymete A, Hailu A, Rohloff J. In vitro evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of *Artemisia absinthium* and *echinops kebericho*. *Chemistry & Biodiversity Chem Biodivers*. 2011; 8: 614-23. Doi: 10.1002/cbdv.201000331.
103. Patrícia S L, Tatiana S T, Luis G M, Paloma K M. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005; 41: 85-94.

104. Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Koochehi A, Afsharian SH, Alizadeh Behbahani B. Antimicrobial properties of plant extracts of *Thymus vulgaris* L. *Ziziphora tenuior* L. and *Mentha Spicata* L. against important foodborne pathogens in vitro. *Sci J Microbiol*. 2013; 2: 23-30.
105. Soltani Nejad Sh. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oil against some pathogenic bacteria. *Afr J Microbiol Res*. 2012; 6: 1504-1508.
106. امیری ح. شناسایی مواد تشکیل دهنده و بررسی اثرات آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره متانولی گیاه کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides* Lam) در مرحله قبل از گلدهی. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان. دوره شانزدهم. شماره 1. 1387: 79-86.
107. Shahverdi AR, Monsef-Esfahani HR, Nickavar B, Bitarafan L, Khodae S, Khoshakhlagh N. Antimicrobial activity and main chemical composition of two smoke condensates from *Peganum harmala* seeds. *Z. Naturforsch*. 60c. 2005; 707-710.
108. Lamchouri F, Settaf A, Cherrah Y, Zemzami M, Lyoussi B, Zaid A, Atif N, Hassar M. Antitumour principles from *Peganum harmala* seeds. *Therapie*. 1999 ; 54: 753-8.
109. Khademalhosseini AA, Tabatabaei A, Akbari P, Fereidouni MS, Akhlaghi M. Comparison of in vivo antiseptic and in vitro antimicrobial effects of *Peganum harmala* L. seeds ethanolic extract with Betadine. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2015; 3: 70-77.
110. Di Giorgio C, Delmas F, Ollivier E, Elias R, Balansard G, Timon-David P. In vitro activity of the beta-carboline alkaloids harmane, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. *Exp Parasitol*. 2004; 106: 67-74.
111. Carvalho M, Ferreira PJ, Mendes VS, Silva R, Pereira JA, Jerónimo C, Silva BM. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48: 441-7.
112. Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Valentão P, Andrade PB, Ferreira IC, Ferreres F, Bento A, Seabra R, Estevinho L. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45: 2287-95.

Evaluation of *in vitro* anti-Toxoplasma effects of *Ziziphora Tenuior*, *zingiber officinale*, *Juglans regia*, *Melia azedarach* and *Peganum harmala* herbal extracts.

Abstract

Introduction: Synthetic anti-Toxoplasma drugs have different side effects, especially suppression of haematopoiesis that has a great importance in primary Toxoplasma infections during pregnancy. Access to a new drug with fewer side effects is a major objective of Toxoplasma researches. In the recent years, it has been shown that some of herbal extracts/fractions have inhibitory effects on tachyzoites of *T. gondii* in cell culture.

Objective: In the present study, we have investigated lethal effects of *Ziziphora Tenuior*, *zingiber officinale*, *Melia azedarach*, *Juglans regia* and *Peganum harmala* extracts on RH strain tachyzoites of *T. gondii* *in vitro* and cell culture.

Materials and Methods: Propagated tachyzoites in peritoneum cavity of mice were harvested and washed with saline. Afterward, 10^6 of fresh tachyzoites were treated with concentrations of 10, 50, 100, and 200 mg/ml of the extracts in microtubes, separately. After 10, 30, and 45 minutes incubation in room temperature, the tachyzoites were stained with alkaline methylene blue and then, mortality rate of killed tachyzoites were counted using optical microscope and compared with controls (untreated tachyzoites with the extracts). Killing of tachyzoites by the extracts were also confirmed by bioassay in mice. In other experiment, the tachyzoites were treated with concentrations of 50, 100 and 200 μ g/ml of *Ziziphora Tenuior*, *Juglans regia* and *Peganum harmala* ethanolic extracts in cell culture (HeLa cell). Pyrimethamine was used as control. Cytotoxicity effects of herbal extracts and pyrimethamine were determined by MTT assay and their EC50 and selectivity were calculated. All experiments were performed in triplicate with three replicates per sample. Statistical analysis

of the data was performed using SPSS software (ver16.0) and ANOVA and Post HocTests. EC50 was calculated using prism software.

Results: The mortality rates of the tachyzoites were 100% with concentrations of 100 and 200 mg/ml of *Ziziphora tenuior*, *Juglans regia* and *Peganum harmala* extracts after 10, 30, and 45 minutes incubation in room temperature. In concentrations of 50 mg/ml of *Juglans regia*, 100% tachyzoites were killed. Mortality rate of *zingiber officinale* was between $80.75 \pm 9.53\%$ and $10.86 \pm 3.42\%$ (maximum and minimum mortality), respectively. The highest mortality rate for *Melia azedarach* extract was $5.24 \pm 3.4\%$.

By bioassay in mice, all of the mice inoculated with RH tachyzoites which showed 100% mortality by staining, survived one month post inoculation. In cell culture, EC50 and selectivity were 154.7 and 0.86 for *Ziziphora tenuior*, 207.4 and 0.78 for *Juglans regia*, 179.1 and 0.52 for *Peganum harmala*, respectively. Also, EC50 and selectivity were 0.176 and 3.40 for pyrimethamine, respectively.

Conclusion: Based on our finding, all of the herbal extracts have anti-Toxoplasma activities with dose-dependent lethality. It was significantly high for *Ziziphora tenuior*, *Juglans regia* and *Peganum harmala* extracts in comparison with *Zingiber officinale* and *Melia azedarach* extracts.

Key words: Toxoplasma gondii, herbal extract, *Ziziphora Tenuior*, *zingiber officinale*, *Melia azedarach*, *Juglans regia* and *Peganum harmala*, in vitro